



Universidad Autónoma
de Madrid

TESIS DOCTORAL

DISEÑO DE VACUNAS FRENTE AL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA BASADAS EN LA UTILIZACIÓN DE PSEUDOPARTÍCULAS VIRALES DE RHDV

Giselle A. Rangel Tapia!

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
DOCTORADO EN BIOCIENCIAS MOLECULARES

MADRID, 2019



Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica

Diseño de vacunas frente al virus de la fiebre aftosa basadas en la utilización de pseudopartículas virales quiméricas de RHDV

-TESIS DOCTORAL-

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en
Biociencias Moleculares

Giselle Angeline Rangel Tapia

Lic. en Medicina Veterinaria

DIRECTORES DE TESIS:

Esther Blanco Lavilla

CISA-INIA

Alí Alejo Herberg

CISA-INIA

Madrid, 2019

El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA) perteneciente el Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria (INIA) bajo la dirección conjunta de los doctores Esther Blanco Lavilla y Alí Alejo Herberg. Fue financiada a través de una beca del Programa de ayuda de contratos predoctorales para la Formación de Personal Investigador FPI 2014, con referencia; BES-C-20140091, asociado al Proyecto de I+D+i: AGL2013-48923-C2-1-R.



Los doctores, Esther Blanco Lavilla y Alí Alejo Herberg. Investigadores titulares del Centro de Investigación en Sanidad Animal del Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria,

CERTIFICAN:

Que la memoria que lleva por título: “Diseño de vacunas frente al virus de la fiebre aftosa basadas en la utilización de pseudopartículas virales quiméricas de RHDV”, elaborada por la licenciada D^a Giselle Angeline Rangel Tapia, ha sido realizada bajo su dirección y reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor en Biociencias Moleculares

Madrid, mayo, 2019

Fdo.: Esther Blanco Lavilla

Fdo.: Alí Alejo Herberg

Agradecimientos

Siempre me he considerado del tipo de personas que lucha hasta al cansancio por lo que quiere y aunque tenía bien claro que no iba a ser fácil, jamás me hubiese imaginado todo lo que supuso para cumplir con ésta meta. He perdido muchas cosas por el camino, pero también he ganado muchas otras, y ahora que estoy por finalizar a través de esta tesis, una etapa de mi vida, no puedo sentirme más que feliz y satisfecha conmigo misma por lograr con lo que fue sin duda, una experiencia enriquecedora tanto a nivel personal como profesional. Sin embargo, todo esto hubiese sido imposible sin la participación de todas aquellas personas que han aportado a su manera, para que esto fuese posible.

Quiero empezar dándole gracias a Dios por guiar siempre mi vida, bendecirme con tantas lecciones y recompensas, por ponerme en situaciones que me enseñaron a valorar lo que de verdad importa y demostrarme su amor a través de las personas que ha puesto en mi camino, angelitos que me han tendido la mano cuando más me ha hecho falta. Por eso para mí es un verdadero placer dedicarles en este apartado mi más sincero agradecimiento a todas esas personas.

Mil gracias a todos los que forman parte de la familia CISA, especialmente al grupo de investigación L3/L7: Juan, Esther, Alí, Yoli, Bea, Noelia, María y Carolina, quienes han contribuido de una u otra manera, facilitado de su tiempo, esfuerzo y trabajo arduo para que llegase a feliz término este proyecto. De manera especial quiero agradecer a mis directores de tesis, Esther y Alí, primero por aceptarme para hacer la tesis bajo su dirección y segundo, por todo su apoyo, por compartir conmigo su amplio conocimiento y sobre todo por la confianza depositada durante estos 4 años. Aunque he de decir que a veces me volví loca, siendo cada uno con personalidades tan distintas, pero creo que al final ha sido provechoso para mí aprender de las fortalezas de cada uno, como el pensamiento crítico de Alí y la metodología de Esther, para marcar positivamente mi formación como investigadora. Asimismo, también destacar la siempre disponibilidad para ayudar y generosidad de los queridísimos vecinos del L5: Vero, Noemí, Migue, Dani y José.

También agradecer al Dr. Hiscott y su equipo de trabajo en el laboratorio Pasteur Italia, por permitirme colaborar durante cuatro meses entre su grupo, por su amabilidad y disponibilidad durante mi estancia para alcanzar los objetivos propuestos y que han aportado resultados a esta tesis.

De manera especial, para mis compis del labo Bea y Yoli, gracias por aguantarme, por su paciencia, que además de brindarme sus conocimientos y experiencias, también me han permitido considerarlas amigas, todas esas conversaciones de plano personal han sido vitales en muchos momentos donde parecía que no podía más.

Gracias para todos esos amigos con los que he compartido en las buenas y malas durante estos años, y que se han convertido en mi familia en Madrid. Muchos de ellos que ahora tengo repartidos por medio mundo, pero que nunca olvidaré. Y a mis amigos en Panamá, de quienes siempre he recibido palabras de aliento, gracias por no dejar que el tiempo ni la distancia afectaran nuestra amistad.

Por supuesto el agradecimiento más profundo para mi familia, José, mis hermanos, mis cuñadas, mis sobrinos. Gracias por su apoyo incondicional, por comprenderme, por su paciencia, por sacrificar conmigo, tantos momentos como familia y recargarme de fuerza y energía cada vez que fui casa. A mis padres, que les estaré eternamente agradecida por educarme como persona y darme la oportunidad de crecer como profesional. A mi padre, que desde el cielo me cuida y a mi madre, que con su dedicación profesional y carisma, ha sido siempre mi más grande fuente de inspiración y ejemplo.

Clave de abreviaturas

aa	aminoácidos	ELISA	ensayo por inmuabsorción ligado a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay)
Acs	anticuerpos		
AcsN	anticuerpos neutralizantes	ELISPOT	ensayo de puntos por inmunoabsorción ligado a enzima, de sus siglas en inglés Enzyme-linked immunospot assay
AdV	adenovirus		
Ad5	adenovirus humano tipo 5		
APC	de sus siglas en inglés antigen presenting cells, células presentadoras de antígeno	FA	Fiebre Aftosa
		H5	High-five, línea celular de insecto establecida derivada de larvas de <i>trichoplusia ni</i>
ATCC	colección americana de tipos celulares (American Type Cell Collection)	HRP	horeseradish peroxidase
BSA	seroalbúmina bovina	HS	heparán sulfato
CD4+	linfocito T fenotipo CD4	IE	índice de estimulación
CD8+	linfocito T fenotipo CD8	IFN	interferón
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario	Ig	inmunoglobulina
		IM	intramuscular
CMSP	células mononucleares de sangre periférica	kb	kilo base
		Log₁₀	logaritmo base 10
C-T	carboxilo terminal	MAb	anticuerpo monoclonal
DIVA	vacunas marcadas, de sus siglas en inglés Differentiating infected from vaccinated animals	MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
		N-T	amino terminal
DL50	dosis letal 50%	OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
DMEM	dulbecco-modified Eagle medium	ORF	fase abierta de lectura
DMSO	dimetilsulfóxido	pb	post-boost
DNA	ácido desoxirribonucleico	PBS	tampón fosfato salino
DNasa	desoxirribonucleasa	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
dpb	días post boost o recuerdo	pfu	unidad formadora de placa
dpd	días post desafío	rAdV	adenovirus recombinante
EDTA	ácido etilén diamino tetra acético	rBV	baculovirus recombinante

RHDV	virus de la Enfermedad hemorrágica del conejo	SDS-PAGE	electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida
RNA	ácido ribonucleico	SFB	suero fetal bovino
RPMI	medio Roswell Park Memorial Institute	TCID₅₀	cantidad de virus capaz de producir efecto citopático en el 50% de los pocillos inoculados
RT-PCR	reacción de transcripción inversa seguida de amplificación por PCR	VFA	Virus de la Fiebre Aftosa
SAT	serotipos de VFA detectados en los territorios de África del Sur	VLPs	pseudopartículas virales, por sus siglas en inglés del Virus like particles
SC	subcutánea	UTR	región genómica no traducida
		WB	inmunodetección de proteínas en membrana (Western blot)

Códigos de una y tres letras para los aminoácidos:

Alanina	Ala, A	Leucina	Leu, L
Arginina	Arg, R	Lisina	Lys, K
Ácido aspártico	Asp, D	Metionina	Met, M
Asparagina	Asp, N	Fenilalanina	Phe, F
Cisteína	Cys, C	Prolina	Pro, P
Ácido glutámico	Glu, E	Serina	Ser, S
Glicina	Gly, G	Tirosina	Tyr, Y
Glutamina	Gln, Q	Treonina	Thr, T
Histidina	His, H	Triptófano	Trp, W
Isoleucina	Ile, I	Valina	Val, V

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	
1.1. Situación actual de las vacunas de nueva generación en Medicina Veterinaria	3
1.1.1. Vacunas basadas en pseudopartículas virales (VLPs)	5
1.1.2. VLPs como presentadoras de antígenos exógenos	7
1.1.3. VLPs del virus de la Enfermedad Hemorrágica del conejo (RHDV)	9
1.1.4. Vacunas basadas en adenovirus recombinante	11
1.2. La enfermedad de Fiebre Aftosa (FA)	12
1.2.1. El virus de la FA: organización del genoma y proteínas de VFA	13
1.2.2. El virus de la FA: determinantes antigénicos y epítomos inmunogénicos	14
1.2.3. Epidemiología de la FA: distribución actual de la enfermedad	17
1.2.4. Vacunas contra la FA	18
1.2.4.1. Vacunas actualmente en uso	18
1.2.4.2. Otras vacunas en desarrollo	19
2. <u>OBJETIVOS</u>	23
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	
3.1. Materiales	24
3.1.1. Virus	24
3.1.2. Células	25
3.1.3. Animales	26
3.1.4. Oligonucleótidos	26
3.1.5. Péptidos	27
3.1.6. Anticuerpos	28
3.1.7. Isótopos radioactivos y mitógenos	29
3.1.8. Medios, tampones y sustratos	29
3.1.9. Marcadores y tinciones	31
3.1.10. Materiales varios	31
3.2. Métodos	32
3.2.1. Mantenimiento de líneas celulares	32
3.2.2. Producción de VFA	32
3.2.3. Titulación de VFA	32

3.2.4.	Extracción de RNA y síntesis de cDNA a partir de muestras celulares	33
3.2.5.	Transcripción <i>in vitro</i> de DNA	33
3.2.6.	Cultivo de bacterias, transformación y purificación de ADNs plasmídicos	33
3.2.7.	Clonaje de los plásmidos para la generación de baculovirus recombinantes	34
3.2.8.	Obtención de baculovirus recombinantes para la expresión de VLPs quiméricas	35
3.2.9.	Expresión de proteínas recombinantes y purificación de VLPs	35
3.2.10.	Microscopía electrónica	36
3.2.11.	Obtención de adenovirus recombinantes	36
3.2.12.	Purificación de adenovirus recombinantes	38
3.2.13.	Análisis de proteínas por SDS-PAGE	
3.2.13.1.	Tinción con azul de Coomassie	38
3.2.13.2.	Transferencia de proteínas e inmunodetección en membranas (WB)	38
3.2.14.	Experimentación animal	
3.2.14.1.	Inmunización	39
3.2.14.2.	Desafío viral con VFA	40
3.2.15.	Obtención de células primarias para ensayos funcionales	40
3.2.16.	Ensayos para la caracterización de la respuesta inmune	
3.2.16.1.	Ensayos para la evaluación de la respuesta humoral	41
3.2.16.2.	Ensayos para la evaluación de la respuesta celular	43
3.2.17.	Selección y caracterización de mutantes de escape de VFA	43
3.2.18.	Análisis estadístico	44

4. **RESULTADOS**

4.1. **Inducción de respuestas inmunes específicas frente al VFA en modelo murino**

utilizado VLPs quiméricas de RHDV presentadoras de epítomos B y T de VFA [45](#)

4.1.1.	Generación y caracterización de VLPs quiméricas RHDV-VFA	45
4.1.2.	Inmunogenicidad en ratón de VLPs quiméricas RHDV-VFA	47
4.1.2.1.	Respuesta humoral inducida por las VLPs quiméricas RHDV-VFA	47
4.1.2.2.	Respuesta celular inducida por las VLPs quiméricas RHDV-VFA	50

4.2. **Inmunogenicidad y protección inducida en cerdo por la VLP quimérica**

RHDV-VFA frente al desafío viral [51](#)

4.2.1.	Respuesta humoral inducida por la VLP quimérica RHDV-VFA L-B/N-T	51
4.2.2.	Respuesta celular inducida por la VLP quimérica RHDV-VFA L-B/N-T	54
4.2.3.	Protección frente al VFA conferida por la VLP quimérica RHDV-VFA L-B/N-T	56

4.3. Inmunogenicidad inducida por una VLP quimérica RHDV-VFA que presenta una versión elongada del epítipo T del VFA	<u>58</u>
4.3.1. Generación y caracterización de la VLPs quimérica RHDV-VFAL-B/N-T2	58
4.3.2. Respuesta humoral y celular inducida en ratón por la VLP quimérica RHDV-VFAL-B/N-T2	59
4.3.3. Potenciación de la respuesta inmune de VLP quimérica L-B/N-T2 mediante la incorporación de M8 (ligando de RIG-I) como adyuvante	62
4.3.4. Protección frente al VFA conferida por la VLP quimérica RHDV-VFAL-B/N-T2	65
4.3.5. Caracterización de los AcsN inducidos por la VLP RHDV-VFA: selección de mutantes de escape en cultivos celulares	69
4.4. Utilización de Adenovirus recombinante que expresa la proteína 3D de VFA para la inducción de una respuesta celular efectora <i>in vivo</i>	<u>70</u>
4.4.1. Generación y caracterización de AdV recombinantes que expresan la proteína 3D del VFA	70
4.4.2. Inmunogenicidad frente al VFA inducida por el rAdV-3D	71
4.4.3. Generación y caracterización de VLP quimérica RHDV-VFA que presenta el epítipo B del serotipo C de VFA	72
4.4.4. Inmunogenicidad y protección frente al desafío con el VFA conferidas por una estrategia de inmunización prime-boost con el Advr-3D y la VLP quimérica RHDV-VFA L-B C S8c1	74
4.4.4.1. Análisis de la respuesta humoral	74
4.4.4.2. Análisis de la respuesta celular	76
4.4.4.3. Análisis post desafío viral	77
4.5. Diseño de VLPs quiméricas de RHDV multivalentes presentadoras de epítopos heterólogos del VFA	<u>77</u>
4.5.1. Generación y caracterización de VLPs quiméricas de RHDV-VFA que presentan epítopos B de VFA en los bucles 1 y 2 de la proteína VP60	78
4.5.2. Inmunogenicidad inducida en ratón por VLPs quiméricas RHDV-VFA que presentan el epítipo B de VFA en L o L2	79
4.5.3. Generación y caracterización de VLPs quiméricas de RHDV-VFA que presentan simultáneamente epítopos B de los serotipos O y A de VFA	80
4.5.4. Inmunogenicidad multivalente inducida en ratón por las VLPs quiméricas RHDV-VFA	81

5. <u>DISCUSIÓN</u>	
5.1. Desarrollo de nuevas estrategias de vacunación frente al virus de la fiebre aftosa basadas en pseudo-partículas virales de RHDV	84
5.2. VLPs quiméricas de RHDV que presentan epítomos de VFA inducen respuesta humoral específica y potente frente a FA y confieren protección parcial frente al desafío viral	85
5.3. Estrategias para mejorar la respuesta celular específica frente a VFA inducida por VLPs quiméricas de RHDV que presentan epítomos de VFA; utilización como adyuvante de un compuesto agonista de RIG I	92
5.4. Estrategias para mejorar la respuesta celular específica frente a VFA inducida por VLPs quiméricas de RHDV que presentan epítomos de VFA; la elongación del epítomo T de VFA presentado por la VLP quimérica de RHDV (L-B/NT-2)	93
5.5. La inmunización con un sistema de vacunación prime-boost utilizando rAdV 3D y VLP quimérica RHDV-VFA, potencia la respuesta celular frente al VFA en el modelo murino	95
5.6. Vacunas multiméricas frente a VFA basadas en VLPs quiméricas de RHDV que presentan epítomos B heterólogos simultáneamente	97
6. <u>CONCLUSIÓN</u>	100
7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	101

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 1. Introducción

• Tabla 1.1. Vacunas de nueva generación veterinarias	4
• Tabla 1.2. Presentación inmunogénica de diversos péptidos foráneos utilizando como plataforma VLPs	8

Capítulo 3. Materiales y Métodos

• Tabla 3.1. Descripción de los cepas de VFA utilizados	24
• Tabla 3.2. Descripción de los baculovirus recombinantes (rBV) generados	24
• Tabla 3.3. Descripción de los adenovirus utilizados	25
• Tabla 3.4. Descripción de las células utilizadas	25
• Tabla 3.5. Lista de oligonucleótidos utilizados	26
• Tabla 3.6. Descripción de los péptidos B diseñados	27

• Tabla 3.7. Descripción de los Acs utilizados	28
• Tabla 3.8. Descripción de isótopos radioactivos y mitógenos empleados	29
• Tabla 3.9. Descripción de medios de cultivo, búferes y sustratos utilizados	29
• Tabla 3.10. Descripción de marcadores y tinciones utilizados	31
• Tabla 3.11. Descripción de otros reactivos y materiales utilizados	31
• Tabla 3.12. Nomenclatura y contenido de los plásmidos generados	34
• Tabla 3.13. Sistema de puntaje establecido para evaluar la clínica post desafío en cerdos	40

Capítulo 4. Resultados

• Tabla 4.1 Descripción de las mutaciones encontradas y la capacidad de escape de la actividad neutralizante en las poblaciones virales seleccionadas en cultivos celulares	70
---	--------------------

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1. Introducción

• Figura 1.1. Esquema de las características generales de las VLPs	7
• Figura 1.2. Modelo atómico de un monómero de la proteína de la cápsida de RHDV, VP60	10
• Figura 1.3. Mapa esquemático del genoma del VFA	13
• Figura 1.4. Descripción esquemática de la localización de los cinco sitios antigénicos neutralizantes del VFA	15
• Figura 1.5. Mapa esquemático de la distribución actual de la Enfermedad de la Fiebre Aftosa y del VFA	17

Capítulo 3. Materiales y Métodos

• Figura 3.1. Obtención de adenovirus recombinantes mediante una estrategia de clonaje con tecnología In-Fusion	37
---	--------------------

Capítulo 4. Resultados

• Figura 4.1. Representación esquemática de los mutantes de inserción de la proteína VP60 que incorporan epítopos B y T de VFA	45
• Figura 4.2. Análisis de los mutantes de inserción de la proteína VP60	46
• Figura 4.3. Esquema de la inmunización de ratones con las VLPs quiméricas RHDV-VFA	47
• Figura 4.4. Respuesta humoral inducida por las VLPs quiméricas RHDV-VFA en ratón	48
• Figura 4.5. Títulos de isotipos de Acs específicos	49
• Figura 4.6. Actividad neutralizante frente al VFA inducida por las VLPs RHDV-VFA	49

• Figura 4.7. Ensayo ELISPOT IFN γ	50
• Figura 4.8. Esquema de la inmunización y desafío de cerdos con la VLPs quimérica RHDV-VFA	51
• Figura 4.9. Respuesta humoral inducida en cerdo por VLPs quiméricas de RHDV que presentan epítomos B y T del VFA	52
• Figura 4.10. Títulos de Acs específicos anti-péptido B (VFA) de las subclases de IgG (IgG1, IgG2) e IgA	53
• Figura 4.11. Cinética de AcsN frente al VFA inducidos por la VLP quimérica L-B/N-T en cerdos	54
• Figura 4.12. Respuesta celular específica desarrollada en cerdos inmunizados con VLP quimérica RHDV-VFA	55
• Figura 4.13. Respuesta proliferativa de CMSP estimuladas <i>in vitro</i> con los péptidos B y T de VFA y la proteína VP60	56
• Figura 4.14. Evaluación clínica de los cerdos inmunizados con VLP RHDV-VFA y sus controles tras el desafío con VFA	57
• Figura 4.15. Representación esquemática del mutante de inserción de la proteína VP60 que incorpora el epítomo B y la versión elongada del epítomo T de VFA	58
• Figura 4.16. Análisis de los mutantes de inserción de la proteína VP60 que incorporan el epítomo B y la versión elongada del epítomo T de VFA	59
• Figura 4.17. Esquema de la inmunización de ratones con las VLPs quiméricas RHDV-VFA	59
• Figura 4.18. Respuesta humoral inducida por VLPs RHDV-VFA en ratones	60
• Figura 4.19. Títulos de isotipos de Acs específicos frente VFA	60
• Figura 4.20. Actividad neutralizante frente al VFA inducida por las VLPs RHDV-VFA	61
• Figura 4.21. Ensayo ELISPOT IFN γ	61
• Figura 4.22. Esquema de la inmunización de ratones con VLPs RHDV-VFA en presencia de los adyuvantes Montanide y M8	62
• Figura 4.23. Comparación de la respuesta humoral inducida por VLPs RHDV-VFA en ratones en presencia de Montanide o de M8	62
• Figura 4.24. Títulos de isotipos de Acs específicos frente VFA	63
• Figura 4.25. Actividad neutralizante frente al VFA inducida por las VLPs RHDV-VFA	64
• Figura 4.26. Ensayo ELISPOT IFN γ	64
• Figura 4.27. Esquema de la inmunización y desafío de cerdos con la VLPs quimérica RHDV-VFA	65

• Figura 4.28. Respuesta humoral inducida en cerdo por VLPs quiméricas de RHDV que presentan epítomos B y T2 del VFA	66
• Figura 4.29. Cinética de AcsN desarrollados por cerdos inmunizados con VLPs RHDV-VFA durante el experimento	76
• Figura 4.30. Respuesta proliferativa de CMSP estimuladas <i>in vitro</i> con el péptido T de VFA y VP60	68
• Figura 4.31. Análisis clínico post-desafío	68
• Figura 4.32. Esquema de obtención de mutantes de escape de VFA	69
• Figura 4.33. Expresión de la proteína 3D de VFA por adenovirus recombinantes	71
• Figura 4.34. Esquema de la inmunización y desafío de ratones con la rAdV-3D de VFA	71
• Figura 4.35. Respuesta celular específica inducida por rAdV-3D <i>in vivo</i>	72
• Figura 4.36. Representación esquemática de la VLP quimérica RHDV-VFA L-B S8c1	72
• Figura 4.37. Análisis de la VLP quimérica RHDV-VFA L-B S8c1 purificado	73
• Figura 4.38. Esquema de la inmunización con sistema prime boost heterólogo utilizando VLP quimérica RHDV-VFA más rAdV-3D y desafío viral en ratones	74
• Figura 4.39. Respuesta humoral inducida por VLP quimérica RHDV-VFA L-B C S8c1 en ratón	75
• Figura 4.40. Títulos de isotipos de Acs específicos	76
• Figura 4.41. Actividad neutralizante frente al VFA inducida por VLP quimérica RHDV-VFA L-B C S8c1	76
• Figura 4.42. Respuesta celular específica inducida durante la vacunación rAdV-3D más VLP RHDV-VFA en ratones	77
• Figura 4.43. Evaluación del desafío viral con VFA en ratones inmunizados con VLP RHDV-VFA más rAdV-3D	77
• Figura 4.44. Representación esquemática de los mutantes de inserción de la proteína VP60 que incorporan el epítomo B de O UK en L o L2	78
• Figura 4.45. Análisis de los mutantes de inserción de la proteína VP60 que incorporan los epítomos B de serotipos O en Loop 1(L) y Loop 2 (L2)	79
• Figura 4.46. Esquema de la inmunización de ratones con las VLPs quiméricas RHDV-VFA	79
• Figura 4.47. Respuesta humoral inducida por VLPs RHDV-VFA en ratones	79
• Figura 4.48. Actividad neutralizante frente al VFA inducida por las VLPs RHDV-VFA	80
• Figura 4.49. Representación esquemática de los mutantes de inserción de la proteína VP60 que incorporan epítomos B de los serotipo O y A de VFA	81
• Figura 4.50. Análisis de los mutantes de inserción de la proteína VP60 que incorporan	

epítomos B de los serotipos O y A de VFA	<u>81</u>
• Figura 4.51. Esquema de la inmunización con las VLPs quiméricas RHDV-VFA que presentan epítomos B heterólogos	<u>82</u>
• Figura 4.52. Respuesta humoral de VLPs quiméricas RHDV-VFA que presentan epítomos B heterólogos	<u>82</u>
• Figura 4.53. Actividad neutralizante frente al VFA inducida por VLPs quiméricas RHDV-VFA que presentan epítomos B heterólogos	<u>83</u>

Resumen

El desarrollo de nuevas estrategias de vacunación frente a patógenos infecciosos es un área de investigación relevante en ganadería. Existe la necesidad de disponer de nuevas vacunas seguras, económicas y que permitan la diferenciación serológica entre animales vacunados e infectados (vacunas DIVA). En los últimos años se han descrito antígenos (péptidos sintéticos y proteínas recombinantes) con potencial para evocar una respuesta inmune protectora frente a distintas enfermedades de interés ganadero. Aunque en ciertos casos estas aproximaciones han demostrado una eficacia razonable, es conocido que por lo general, este tipo de antígenos son débilmente inmunogénicos por sí mismos. Por lo tanto, abordajes concebidos para incrementar la eficacia de las vacunas de subunidades, como su incorporación a VLPs para su presentación multimérica, resultan muy relevantes de cara a hacer viable la generalización de su uso. Las VLPs del calicivirus de la Enfermedad Hemorrágica del conejo (RHDV) constituyen un excelente vector vacunal. Han demostrado su capacidad para inducir una respuesta inmune protectora frente a la enfermedad del virus del cual derivan, así como de inducir una respuesta inmune celular y humoral específica frente a distintos epítomos heterólogos incorporados en la partícula viral. Esta tesis doctoral tuvo como objetivo general, el diseño de vacunas recombinantes frente a la Fiebre Aftosa basadas en las VLPs de RHDV. La Fiebre Aftosa es una enfermedad de gran relevancia en sanidad animal cuyo agente causal, el virus de la Fiebre Aftosa (VFA), está bien caracterizado y para el cual se han definido epítomos inmunodominantes para la activación tanto de células T como de células B. Los objetivos específicos de esta tesis incluyeron: Primero, la generación de VLPs quiméricas de RHDV presentadoras de epítomos B y T de VFA. Segundo, la evaluación *in vivo* de la respuesta inmune generada por las nuevas VLPs en modelo murino y porcino, así como la evaluación de su capacidad de inducir protección frente al desafío viral en este último. Tercero, estudiar la versatilidad de las VLPs de RHDV para permitir la incorporación de diferentes epítomos en una única molécula y evaluar la inducción de una inmunogenicidad multivalente. Por último, la generación de un adenovirus recombinante que expresa la proteína 3D de VFA, altamente conservada entre serotipos se estudió como estrategia para la potenciación de la respuesta de células T *in vivo*. Los resultados descritos en esta tesis doctoral demuestran que las VLPs derivadas de RHDV constituyen una plataforma eficaz para la presentación de epítomos heterólogos e inducción de respuestas neutralizantes frente a, al menos, tres serotipos de VFA distintos. Mediante ensayos *in vivo* de vacunación y desafío, han demostrado inducir una respuesta neutralizante comparable o superior a la obtenida a través de la vacuna convencional en porcinos. Además, la VLP de RHDV demostró admitir la incorporación de epítomos B heterólogos en dos sitios de inserción distintos de manera simultánea, logrando generar una respuesta humoral multivalente ante los serotipos O y A de VFA. Finalmente el adenovirus recombinante 3D de VFA fue capaz de inducir una respuesta celular específica *in vivo*.

Abstract

Development of new vaccine strategies against infectious diseases is a major field of research for livestock industry. There is a real need to generate new cost-effective, safe vaccines adequate to serologically differentiate between vaccinated and infected animals (DIVA vaccines). In the past years, new antigens have been described (synthetic peptides and recombinant proteins) which are potentially protective against different diseases of interest in animal health. However, these types of antigens, afford only a limited level of protection in certain cases and it is widely accepted that they are weakly immunogenic by themselves. Therefore, strategies conceived to enhance the efficacy of subunit vaccines, such as their incorporation into VLP-based delivery systems, for multimeric display, are very relevant if field applications are considered. The VLPs derived from the calicivirus Rabbit Hemorrhagic Disease virus (RHDV) constitute an excellent vaccine vector. They have shown their ability to induce a protective anti-viral immunity against the disease from which it is derived, as well as to induce specific cellular and humoral immune response against heterologous epitopes incorporated into its particle. The general objective of this doctoral thesis was the design of RHDV-based VLPs that may serve as vaccines against Foot-and-Mouth Disease (FMD). This is a disease of utmost relevance in animal health and its causative agent, the Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) is a well characterized pathogen for which immunodominant epitopes for B and T cell activation have been widely defined. The specific objectives of this thesis included: Firstly, the generation of RHDV chimeric VLPs presenting FMDV B and T cell epitopes. Secondly, the *in vivo* evaluation of the immune response generated by RHDV-FMDV chimeric VLPs in murine and porcine models, as well as the evaluation of their ability to induce protective antiviral activity during a viral challenge in pigs. Thirdly, the study of the versatility of RHDV VLPs to allow the incorporation of different peptides in a single molecule and to evaluate the induction of multivalent immunogenicity. Finally, the generation of a recombinant adenovirus expressing the FMDV 3D protein, highly conserved between serotypes and described as a potent inducer of a cellular response was used as a strategy to further enhance virus specific T cell responses *in vivo*. The results presented in this doctoral thesis show that the VLPs derived from RHDV constitute an effective platform for the presentation of heterologous epitopes and the induction of neutralizing responses to at least three different FMDV serotypes. Through *in vivo* vaccination and challenge tests, they have been shown to induce a neutralizing response comparable or superior to that obtained by conventional vaccination in pigs. In addition, the RHDV VLPs proved to be permissive for the incorporation of heterologous B epitopes in two different insertion sites simultaneously, thus generating a multivalent humoral response to FMDV serotypes O and A. Lastly, a recombinant adenovirus expressing FMDV 3D protein was able to induce a specific cellular response *in vivo*.

Capítulo 1

Introducción



1.1. Situación actual de las vacunas de nueva generación en Medicina Veterinaria

La vacunación es una técnica efectiva de la medicina preventiva, cuyo objetivo consiste en inducir inmunidad específica frente a un organismo infeccioso. Su uso en medicina veterinaria permite disminuir la morbilidad y mortalidad de las enfermedades, así como reducir las pérdidas económicas causadas por la aparición de brotes, reducir el uso de antibióticos frente a infecciones secundarias y aumentar el bienestar general de las personas y los animales [1, 2].

En el ámbito veterinario, la gran mayoría de las vacunas en el mercado son de tipo convencional, es decir, que pueden ser inactivadas (microorganismos muertos), atenuadas (microorganismos vivos debilitados o modificados) y toxoides (forma inactiva de la toxina producida por un microorganismo) [3]. Como ventajas de las vacunas convencionales podemos mencionar que son capaces de inducir respuesta humoral y celular. Entre de los mayores triunfos de las vacunas convencionales veterinarias cabe destacar la erradicación global de la peste bovina en el 2011 [4, 5], y la prevista próxima erradicación de otras enfermedades como la de Aujeszky [6] y la Peste de los pequeños rumiantes, que se plantea para el 2030 cuya [7], así como la disminución de la incidencia y mejoras en el control de muchas otras enfermedades. Sin embargo, su utilización y eficacia están limitadas por inconvenientes tales como: costos de producción, la necesidad de una estricta cadena de frío para su mantenimiento, riesgo de reversión de virus a formas virulentas (para vacunas atenuadas) y el riesgo de una deficiente inactivación o de escape viral durante la producción (para vacunas inactivadas), lo que determina restricciones de su uso [8]. Por otro lado, el uso de vacunas convencionales dificulta en general la diferenciación de animales infectados y vacunados, lo que interfiere con el control epidemiológico adecuado de la enfermedad [9]. Por tanto, todavía existen enfermedades de alto riesgo que presentan desafíos significativos para su total control y/o erradicación, y que requieren del desarrollo de vacunas que complementen adecuadamente las disponibles en la actualidad. La implementación de vacunas veterinarias eficaces tiene un impacto importante en la mejora de la seguridad alimentaria y en consecuencia de la salud humana.

Los avances en el conocimiento de técnicas de ingeniería genética y análisis genómico, así como sobre la estructura de patógenos y una mejor comprensión de la respuesta inmune frente a los agentes infecciosos, han dado como resultado el desarrollo de vacunas de nueva generación que se pueden clasificar en:

1. **Vacunas basadas en virus modificados genéticamente:** El conocimiento de la estructura del genoma de muchos virus así como la posibilidad de modificar dicha estructura en el laboratorio está permitiendo la obtención de cepas virales atenuadas por inactivación de genes esenciales para la patogenia. De este modo se han obtenido, por ejemplo, cepas atenuadas del virus de Aujeszky, en las que se eliminó el gen que codifica para la glicoproteína gE. Esta delección además la convierte en una vacuna marcada.

2. **Vacunas de subunidades:** La expresión de determinantes antigénicos por ingeniería genética permite producir y purificar grandes cantidades de antígeno a bajo coste. Para la obtención de proteínas recombinantes con alto rendimiento, se han utilizado distintos sistemas biológicos: bacterias, levaduras, hongos o virus. Por ejemplo, se han utilizado baculovirus recombinantes, que permiten la expresión en células de insecto de proteínas recombinantes correctamente modificadas postraduccionalmente con una gran eficiencia. Con este sistema se han obtenido pseudopartículas virales (virus-like particles, VLPs) derivadas de distintos virus. También es posible la expresión de antígenos en plantas transgénicas o mediante la síntesis química de péptidos. En su mayoría este tipo de vacunas tiene como gran ventaja su seguridad, pero suelen requerir del uso de adyuvantes.
3. **Vacunas basadas en vectores vivos:** La utilización de vectores vivos presenta algunas ventajas importantes, como son requerir una dosis inicial de antígeno baja, la posibilidad de inducir respuesta tanto humoral como celular citotóxica y una prolongación del período de exposición al antígeno. Se pueden usar vectores procariotas como *E.coli* o *Salmonella typhimurium*, o vectores virales como los adenovirus, herpesvirus, virus vaccinia u otros poxvirus (canarypox, fowlpox, virus de orf, etc.).
4. **Vacunas basadas en ácidos nucleicos (DNA-RNA):** Esta estrategia consiste en inmunizar con fragmentos de ácidos nucleicos capaces de mediar la expresión de proteínas derivadas de agentes patógenos. Este tipo de vacunación evita los problemas asociados con algunos vectores vivos y permite la producción endógena de antígeno, posibilitando la inducción de protección mediada por las respuestas humoral y celular.

La tabla 1.1 muestra vacunas de nueva generación veterinarias actualmente disponibles en el mercado.

Tabla 1.1. Vacunas de nueva generación veterinarias. Adaptado de: [3, 9]. Productos biológicos veterinarios actualmente con licencia USDA APHIS Center for Veterinary Biologics, catálogo actualizado hasta Julio 5, 2018.

Indicado para	Patógeno	Tipo de vacuna
Felino	Virus de la Leucemia Felina (VLFe)	Vectorizada por el virus de la viruela del canario (Canarypox)
	Virus de la rabia	
	Virus de la Leucemia Felina (VLFe)	
	Virus de la Leucemia Felina (VLFe)	Subunidad
Bovino	Ripcephalus (Boophilus) microplus	Subunidad
	Ripcephalus (Boophilus) microplus	
	Rinotraqueitis infecciosa bovina (BHV-1)	Virus modificado vivo o inactivado
Canino	Virus del Distemper canino (CDV)	Vectorizada por el virus de la viruela del canario (Canarypox)
	Melanoma oral canino	DNA
	Parvovirus canino (PV)	Virus vivo modificado
	Coronavirus canino (CV)	
Hurón	Virus del Distemper canino (CDV)	Vectorizada por el virus de la viruela del canario (Canarypox)
Pez	Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV)	DNA
	Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV)	

Equino	Virus de la influenza y toxoide tetánico	Vectorizada
	Virus de la influenza	Vectorizada por el virus de la viruela del canario (Canarypox)
	Virus West Nile (WNV)	
	Virus West Nile (WNV)	DNA
	Virus West Nile (WNV)	Flavivirus quimera -Vacuna de virus vivo
Aves	Virus de laringotraqueitis infecciosa	Vectorizada por el virus de la viruela aviar (fowlpox)
	Virus de la influenza aviar	
	Virus de la influenza aviar	Virus quimera H5N3 inactivado
	Virus de la enfermedad de Marek y la bursitis infecciosa aviar	Vectorizada por el virus de Marek (MV)
	Virus de la enfermedad de Newcastle	Vectorizada por el virus de la viruela aviar (fowlpox)
	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Vectorizada
Mapaches/ Coyotes	Virus de la Rabia	Vectorizada por el Virus Vaccinia recombinante
Ovejas/ Cabras	<i>Echinococcus granulosus</i>	Subunidad
Porcino	Virus de la Peste porcina Clásica (PPC)	Vectorizada por Baculovirus recombinante
	Circovirus porcino 2 (PCV2)	
	Circovirus porcino	Subunidad
	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	
	Circovirus porcino 2 (PCV2)	Virus quimera PCV1 y 2 inactivado
	PCV2	VLPs
	Enfermedad de Aujeszki (PRV)	Virus modificado genéticamente (gE deletada);vacuna marcada
	Virus de la Influenza porcina (SIV)	RNA vectorizado por una forma atenuada del Virus de la encefalitis equina venezolana

Las vacunas de nueva generación representan una estrategia atractiva para superar las limitaciones de las vacunas convencionales.

1.1.1. Vacunas basadas en pseudopartículas virales (VLPs)

Las VLPs son ensamblados macromoleculares estructuralmente idénticos o similares a los virus, que carecen del material genético necesario para su replicación. Su obtención se basa en la utilización de la(s) proteína(s) estructural (es) de un virus con capacidad de auto-ensamblarse espontáneamente cuando son producidas mediante un sistema de expresión de proteínas recombinantes. La mayoría de las VLPs tienen un diámetro de entre 20 y 100 nm, un tamaño que permite, tras su inoculación *in vivo*, su transporte de forma libre muy eficientemente hasta la región subcapsular de los ganglios linfáticos, facilitando su interacción directa, en su forma nativa, con los linfocitos B foliculares. Esta propiedad proporciona a las VLPs una gran capacidad para inducir respuesta de Acs y es esencial para la inducción de Acs que reconocen epítopos conformacionales. Por otra parte, su transporte eficiente hasta los ganglios linfáticos permite su interacción con determinadas subpoblaciones de células dendríticas (CDs), que eficientemente las capturan, procesan y presentan mediante moléculas MHC clase I y II, activando

los mecanismos de respuesta celular [10]. En algunos casos, el transporte de las VLPs hasta las células B foliculares se facilita a través de interacciones específicas entre las VLPs y componentes del complemento o Acs [11].

En relación con la estructura de las VLPs, éstas poseen un alto grado de simetría y una geometría bien definida que contribuye a su notable capacidad para activar las células B. Los epítomos presentados en las estructuras multivalentes, altamente repetitivas de las VLPs permiten la unión entrecruzada a los receptores BCR de los linfocitos B, en varias células al tiempo, lo que lleva a una fuerte estimulación de las células B y a la inducción de una respuesta humoral robusta y duradera [12]. Por otro lado, la estructura altamente ordenada de las VLPs constituye patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que activan la respuesta inmune innata, iniciando la producción de citoquinas pro inflamatorias y que contribuyen su elevada inmunogenicidad. En definitiva y debido a las propiedades inherentes de las VLPs tales como, tamaño similar a los virus, presentación multimérica de epítomos, alto grado de organización y falta de infectividad, éstas se han convertido en candidatas atractivas para el desarrollo de vacunas frente a muchas enfermedades [13]. Vacunas comerciales basadas en VLPs de uso en humanos, incluyen Gardasil® y Gardasil9® frente a 4 (6, 11, 16 y 18) o 9 (6, 11, 16, 18, 31,33,45,52 y 58) serotipos del virus del papiloma humano (HPV) [14, 15] y Engerix-B® frente al virus de la hepatitis B (HBV) [16]. En veterinaria, las vacunas comerciales basadas en VLPs son Porcilis® e Ingelvac® CircoFLEX derivadas del circovirus porcino tipo 2 (PCV2) [17, 18].

Las VLPs al igual que los virus de las que derivan, pueden estar formadas por una o varias proteínas y contener o no envuelta lipídica. Ejemplos de VLPs formadas por una única proteína son las VLPs del virus de la Fiebre Hemorrágica del Conejo (RHDV), que es la que se utilizará a lo largo de esta tesis, de la bursitis infecciosa aviar (IBDV) y la del Papilomavirus humano (HPV). Ejemplo de VLPs formadas por múltiples proteínas son las del virus de la Lengua azul (BTV). Las VLPs del virus de la hepatitis B (HBV) carecen de envoltura lipídica mientras que las del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) y el virus influenza sí las tienen [13].

La versatilidad de las VLPs le permite adaptarse funcionalmente a una gran variedad de aplicaciones científicas. Entre ellas las relacionadas con el estudio morfológico sobre estructura, función y ensamblaje de las cápsidas [19] o su utilización como antígenos en el diagnóstico serológico de los virus [20]. También pueden utilizarse para el envío dirigido de fármacos [21], en terapia génica e inmune [22, 23], como alternativa a las partículas virales en el caso de virus que no pueden propagarse eficientemente en cultivos celulares (como RHDV o los virus de la hepatitis B y C) [24] o aquellos cuyo manejo requiere medidas especiales de contención por razones de bioseguridad (como el virus Ébola o SARS) [25, 26]. Además son perfectos candidatos para el desarrollo de vacunas DIVA, particularidad especialmente importante en las vacunas veterinarias [27].

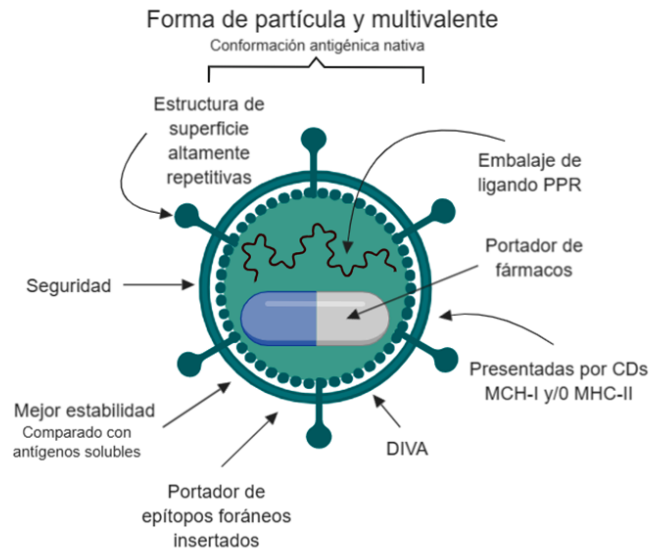


Figura 1.1. Esquema de las características generales de las VLPs. Adaptado de [13, 24]. Las VLP cuentan con características claves que subyacen a su inmunogenicidad, seguridad y potencial como vacunas: a) geometría bien definida y notable uniformidad con estructuras de superficie repetitivas y ordenadas. La presentación multivalente y la estructura altamente ordenada de las VLPs constituyen motivos PAMP comunes a muchos patógenos, que desencadena una respuesta inmune innata. Los PAMPs pueden ser reconocidos por los receptores TLR y otros receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) presentes en las células huésped; b) Pueden ser manipuladas para ser portadoras de epítomos foráneos y fármacos; c) "Autoadyuvantes" por su naturaleza particulada y multivalente, tamaño adecuado para la captación por parte de las CDs para su procesamiento y presentación por MHC-II y MHC-I (presentación cruzada); d) Permiten la adaptación para diferenciar entre vacunados e infectados (DIVA); e) Seguridad por ser no infecciosos y no replicantes; f) Mayor estabilidad que los antígenos solubles.

1.1.2. VLPs como presentadoras de antígenos exógenos

Las VLPs se pueden utilizar como plataforma para la presentación multimérica de epítomos heterólogos (VLPs quiméricas) derivados de otros virus o patógenos, incorporándolos a la VLP tanto por fusión genética como por conjugación química [10, 28, 29]. La fusión genética es aquella en la que se insertan secuencias codificantes de los antígenos foráneos en sitios determinados de la secuencia codificante de la proteína estructural viral correspondiente. En la conjugación química, los antígenos foráneos son sintetizados externamente y se unen a la partícula de la VLP utilizando diversas técnicas de conjugación.

Las estructuras de VLPs quiméricas son capaces de presentar no solo una alta densidad del epítomo exógeno de interés por partícula, sino que también en una estructura adecuada, con conformación tridimensional, lo que es especialmente importante para la presentación de epítomos conformacionales, que además se beneficiarán de la capacidad propia de las VLPs para inducir una respuesta inmune potente [30]. Actualmente hay una gran variedad de estudios que utilizan las VLPs derivadas de varios

agentes virales como estrategia de presentación de epítopos heterólogos. En la Tabla 1.2 se muestran algunos ejemplos de ellos.

Tabla 1.2. Presentación inmunogénica de diversos epítopos exógenos utilizando como plataforma de presentación VLPs quiméricas. Adaptado de: [12, 31, 32]

Virus del cual deriva la VLP	Patógeno/Enfermedad al que va dirigido	Referencias
Bacteriófago MS2	VIH	[33-35] [36, 37]
	VFA	[34]
	Bacillus anthracis	[38]
	Virus Zika	[39]
	Papilomavirus humano	
Virus de la hepatitis B (HBV)	VFA	[40]
	Influenza A	[41]
	Malaria	[42]
	Enterovirus 71	[43]
	Virus de la rubéola	[44]
	Virus del Dengue tipo 2	[45]
	Tuberculosis	[46]
	Virus de la bursitis infecciosa aviar	[47]
Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	Virus del Dengue y West Nile	[48]
Bacteriófago Qβ	Virus Zika	[38]
Bacteriófago P22	Virus sincitial respiratorio	[49]
	Influenza	[50]
El virus del moteado clorótico del caupí (CCMV)	Influenza A	[51]
	VFA	
Flockhouse Virus (FHV)	<i>Bacillus anthracis</i>	[52] [53]
Virus de Newcastle	Virus del Nipah	[54, 55]
	Virus sincitial respiratorio	
Virus de la Influenza	Virus de la bronquitis infecciosa aviar	[56]
	Virus de Newclastle	
	Virus sincitial respiratorio humano	[57] [58]
Papilomavirus humano	Malaria	[59]
virus del mosaico del caupí (CPMV)	Virus de la enteritis del visón (MEV)	[60]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[61]
Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV)	Papilomavirus humano	[62]
	VFA	[63]
	Calicivirus felino	[64]
	Influenza	
	Virus de la Lengua azul	[65]
	Terapia antitumoral	[66-69]
Virus del simio 40 (SV40)	Influenza A	[70]

La producción de las VLPs puede llevarse a cabo en diferentes sistemas de expresión, incluyendo bacterias, levaduras, plantas, células de insecto y de mamífero [71-74]. El método más utilizado es la expresión en células de insecto usando la tecnología de baculovirus recombinantes [75]. Este sistema requiere la producción de baculovirus recombinante que codifica los genes de interés, que luego se usa

para infectar las líneas celulares derivadas de insectos que finalmente producen las VLP [76]. Esta técnica posee numerosas ventajas en la generación de VLPs: 1. Alto rendimiento en la producción de proteínas recombinantes en comparación con los sistemas de expresión con células de mamífero; 2. Las células de insecto utilizadas para la producción de la VLP pueden cultivarse sin suplementos requeridos para células de mamífero, minimizando el riesgo de cultivar patógenos oportunistas; 3. Rango limitado de infección (normalmente restringido a insectos); 4. Versatilidad para la expresión de VLPs formadas por múltiples proteínas; 5. Facilidad para su adaptación a la producción de vacunas a gran escala y 6. Ausencia de virus y toxinas bacterianas que puedan afectar a los mamíferos [72, 77, 78].

1.1.3. VLPs del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV)

El virus de la Enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) pertenece al género *Lagovirus*, en la familia *Caliciviridae* [79]. Es el agente causal de una enfermedad aguda y altamente contagiosa en poblaciones de conejos salvajes y domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) asociada con necrosis y hemorragias, que normalmente provoca la muerte de los animales infectados en 24-48 horas [80]. Los viriones de RHDV carecen de envuelta lipídica, contienen RNA genómico de cadena sencilla, polaridad positiva y un tamaño de 7.5 kb, que codifica una única poliproteína precursora de las proteínas no estructurales y la proteína estructural mayoritaria VP60 [81]. La proteína de la cápsida VP60, tiene la capacidad de autoensamblarse espontáneamente formando VLPs, que son morfológica y antigénicamente muy similares a la partícula viral, cuando dicha proteína se produce mediante sistemas de expresión de proteínas recombinantes [82]. Estas VLPs a diferencia de los viriones, no tienen capacidad de replicación ya que carecen de genoma viral y son por tanto no infecciosas.

Mediante técnicas de criomicroscopía electrónica y reconstrucción tridimensional de imágenes se ha determinado la estructura tridimensional de la cápsida de RHDV a 24 Å de resolución, lo que permitió obtener un pseudomodelo atómico de la proteína VP60 por comparación con las estructuras atómicas resueltas de la cápsida de otros calicivirus [83]. Este modelo se refinó posteriormente hasta una resolución de 8Å [84]. Las VLPs de RHDV de unos 35-40 nm de diámetro, están compuestas por 180 copias de la proteína VP60, ensambladas en una cápsida icosaédrica de 90 dímeros, con una simetría $T = 3$ para formar 12 pentámeros y 20 hexámeros [83]. Cada monómero de la proteína VP60 tiene tres dominios (Figura 1.2), un extremo N-terminal (NTA), un caparazón (S) y un dominio flexible protuberante (P) que se localiza en la superficie de cápsida. En la cápsida el dominio N-terminal queda situado hacia el interior. El dominio S contiene un barril β canónico, formado por 8 cadenas β antiparalelas, y es responsable de formar la cubierta continua (caparazón) esférica de la cápsida. Posee elementos esenciales para la formación de los contactos entre los dímeros de VP60. El dominio P forma las estructuras protuberantes que sobresalen en la superficie de la cápsida de los calicivirus.

El dominio P participa en los contactos intradiméricos que incrementan la estabilidad de la cápsida y se conecta al dominio S mediante una región flexible. El dominio P se subdivide a su vez en P1 y P2, donde

el subdominio P2 está localizado en la superficie de mayor exposición de la cápsida viral. Mientras que el dominio S se encuentra altamente conservado entre los distintos calicivirus, el subdominio P2 es el que presenta mayor variabilidad [85].

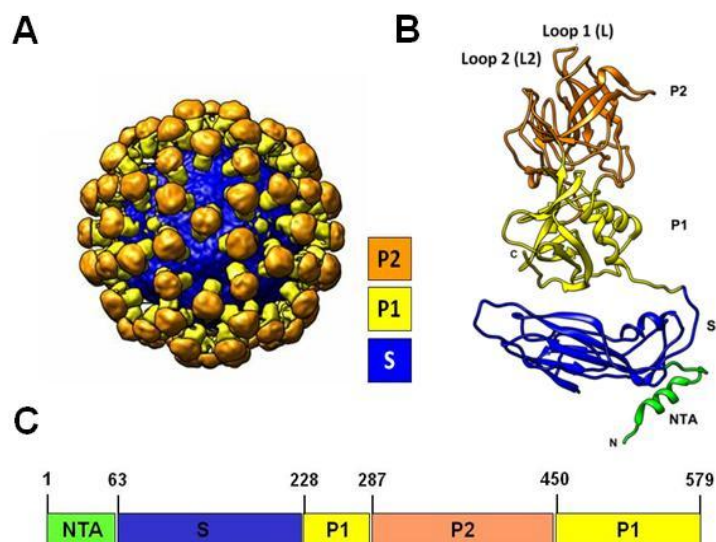


Figura 1.2. Estructura de la cápsida de RHDV y de la proteína VP60. (A) Reconstrucción 3D de la cápsida del virus RHDV. (B) Modelo atómico de un monómero de la proteína VP60 en el que se indican los sitios de inserción utilizados en esta tesis para la presentación de epítopos de VFA; extremo N terminal, Loop 1 (L) y Loop 2 (L2). (C) Esquema de la localización de los dominios de la proteína VP60 en la secuencia lineal. El extremo amino terminal (NTA) representado en verde, el dominio S en azul, el subdominio P1 en amarillo y el subdominio P2 en naranja. Dentro del subdominio P2, están localizados los sitios de inserción Loop 1 (L) y Loop 2 (L2).

Se ha demostrado que las VLPs de RHDV son altamente inmunogénicas y confieren protección en conejo frente al desafío con el virus homólogo [82, 86-88]. También se ha descrito la posibilidad de utilizar las VLPs de RHDV como sistema de presentación de epítopos foráneos. Así, se han identificado posiciones dentro de la secuencia codificante del gen de la proteína VP60, que permiten la incorporación de secuencias heterólogas de hasta 60 aminoácidos (aa), sin alterar el rendimiento de su producción ni la correcta formación de las VLPs [64, 83, 89]. Los sitios de inserción dentro de la proteína VP60 descritos hasta el momento son: en los extremos de la proteína, la región amino terminal (NT) y carboxi terminal (CT) y dentro de subdominio P2, el bucle 1 (L) y finalmente, el bucle 2 (L2), recientemente identificado en nuestro grupo como nuevo sitio de inserción.

Las VLPs de RHDV han demostrado su utilidad en varios campos de la medicina, como la transferencia génica [90], y presentación de epítopos antitumorales [62, 67-69]. Estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que las VLPs de RHDV son eficientemente capturadas por las células dendríticas y capaces de inducir respuestas celulares T CD4⁺ cooperadoras y citotóxicas mediadas por linfocitos T CD8⁺ [63, 89]. Estas VLPs de RHDV han demostrado ser además, inductoras de una potente respuesta inmune humoral frente a epítopos heterólogos insertados en la VP60 [64]. Estas características

junto con el hecho de que pueden producirse con relativa facilidad y en grandes cantidades, las convierte en candidatas muy interesantes para el desarrollo de vacunas de nueva generación. En esta tesis doctoral, se evalúan por primera vez las VLPs de RHDV como plataforma de presentación de epítopos B del virus de la fiebre aftosa (VFA), con el objetivo de desarrollar una alternativa a la vacuna convencional.

1.1.4. Vacunas basadas en adenovirus recombinantes

Los adenovirus son virus DNA de doble cadena con un genoma de 34-43 kpb dependiendo del serotipo. Pertenecen a la familia *Adenoviridae* y están clasificados en 5 géneros, donde todos los Ad humanos (HAdVs) pertenecen al género *Mastadenovirus*, sub agrupándose a su vez en especies de la A a la G, basados en su filogenia, organización del genoma, contenido de G-C, patrones de hemoaglutinación y otras propiedades biológicas [91]. El más ampliamente utilizado como vector es el HAdV 5 especie C, cuyo genoma es de 36kb. Sus viriones tienen un tamaño de 90-100 nm, presentan una morfología icosaédrica y carecen de envuelta. La cápsida viral consta de 252 proteínas, categorizadas en tres tipos distintos: las proteínas que forman la fibra, penton y hexon [92].

Los AdV son altamente inmunogénicos y representan la plataforma de vectores virales más ampliamente utilizada para el diseño de vacunas [93, 94]. Algunas de las razones son: 1. Su genoma está bien caracterizado y es fácil de manipular; 2. La delección de regiones específicas del genoma viral los convierte en vectores con una replicación viral defectuosa, lo que aumenta su seguridad; 3. Los adenovirus tienen un tropismo amplio que infecta una variedad de tipos celulares; 4. Se pueden producir fácilmente en cultivos celulares; 5. Se pueden administrar tanto por vía parenteral, como a través de mucosas y 6. Su relativa termo-estabilidad facilita su uso [95, 96].

El uso de adenovirus recombinante (rAd) para el desarrollo de vacunas veterinarias ha sido estudiado para muchas enfermedades animales. Se ha obtenido protección completa frente al desafío viral en aves con AdV recombinante frente al virus de la bronquitis infecciosa (IBV) y el de la bursitis infecciosa aviar (IBDV). En cánidos se ha usado este vector viral para inducir protección frente al virus del Distemper canino (CDV) y en cerdos para el virus de la Peste Porcina Clásica (CSFC), VFA, virus del Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino (PRRSV), Enfermedad de Aujeszky, Gastroenteritis transmisible (TGEV) y virus de la Influenza porcina (SIV). En rumiantes se ha utilizado para el Herpes virus bovino 1 (BHV-1) y frente al virus de la Peste de pequeños rumiantes (PPRV) [94, 97-100]. También hay estudios que reportan el uso exitoso de adenovirus de chimpancé como vectores vacunales frente a enfermedades zoonóticas como la rabia [101] o la Fiebre del Valle del Rift (RVFV) [102]. A pesar de todos estos estudios, la única estrategia vacunal, basada en Adenovirus recombinantes licenciada para su uso es una basada en un vector adenovirus humano defectivo tipo 5 (Ad5) que contiene la región codificante de las proteínas de la cápsida de VFA del serotipo A24, además de la región codificante de la proteasa 3C. Esta vacuna protege a cerdos y vacas frente al desafío viral y está actualmente aprobada por el departamento

de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) para su producción y utilización solo en un estado de emergencia, en caso de declaración de brotes de VFA en este país [103].

1.2. La enfermedad de Fiebre Aftosa

La fiebre aftosa (FA) es una de las enfermedades animales de mayor importancia a nivel mundial por su rápida y fácil difusión, y por ser la epizootia del ganado doméstico que produce mayores pérdidas económicas tanto en la industria lechera como cárnica [104]. Continúa afectando a más de 100 países, con un gran impacto económico que se ha estimado que oscila entre 5.5-17.8 miles de millones de euros anuales [105]. La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) ha clasificado esta enfermedad dentro de las enfermedades prioritarias y por tanto su control y erradicación constituyen un objetivo de gran importancia en la sanidad animal a nivel mundial.

La FA afecta fundamentalmente a ganado porcino y bovino, aunque también a ovino, caprino y a más de 30 especies de artiodáctilos silvestres [106, 107]. Es una enfermedad muy contagiosa cuya transmisión puede llevarse a cabo por contacto directo, transporte mecánico y aerosoles [108]. El virus penetra por los epitelios de la boca, nariz, laringe o zonas de piel desgarrada, donde produce vesículas o aftas primarias. A los tres o cuatro días comienza la fase de viremia febril en la que el virus se detecta en sangre, aparece la inapetencia y cojeras, asociadas al desarrollo de lesiones vesiculares situadas en miembros anteriores y posteriores, en el epitelio de la boca y morro [109, 110]. Mientras la morbilidad de esta enfermedad es muy elevada (cerca del 100%), la tasa de mortalidad es baja en animales adultos (<5%) aunque puede elevarse en animales juveniles hasta el 50%. A diferencia de los rumiantes, los cerdos son más resistentes que otras especies a la infección vía aerógena [111], siendo más susceptibles a la exposición viral vía oro-faringe, por lo que la infección con el VFA se disemina más rápidamente en cerdos mantenidos juntos [112]. Los cerdos son usualmente considerados de alto riesgo para la diseminación del virus, ya que durante la convalecencia presentan altas tasas de replicación y diseminación viral comparado con otras especies [113].

La gran importancia económica de la FA viene determinada en gran medida por las pérdidas de producción que origina, fundamentalmente en las industrias láctea y cárnica porcina, además de por ser una de las principales causas de restricción del comercio internacional tanto de animales vivos como de productos derivados [114-116]. La aparición de la FA también causa pérdidas derivadas del gasto de vacunación y sacrificio de animales, y puede llegar a afectar a otros sectores de la economía como el turismo. Las pérdidas económicas sufridas por Gran Bretaña durante los brotes de 2001 se estimaron en cerca de ocho mil millones de libras esterlinas [117]. Por otro lado, estudios sobre el efecto psico-social durante el brote en Reino Unido del 2001 [118] demuestran que después del suceso durante más de 18 meses, los ciudadanos de diversos grupos más allá de la comunidad agrícola, reportaban sentimientos de angustia, duelo, miedo a un nuevo desastre, pérdida de confianza en las autoridades y sistemas de control, entre otras.

1.2.1. El virus de la fiebre aftosa: organización del genoma y proteínas virales

El virus de la Fiebre Aftosa (VFA) fue el primer virus animal causante de enfermedad en ser aislado en el año 1898 [119]. Pertenece al género *afivirus*, de la familia *Picornaviridae* y como tal, posee un genoma RNA de cadena sencilla y de polaridad positiva y carece de envuelta lipídica [120, 121]. Su partícula, de unos 30 nm de diámetro tiene simetría icosaédrica T=3 y está formada por 60 capsómeros integrados por cada una de las cuatro proteínas estructurales denominadas VP1, VP2, VP3 y VP4. El VFA es muy lábil a pH ligeramente ácidos, disociándose el virión en partículas con un coeficiente de sedimentación 12S a $\text{pH} < 6.5$ [122].

Su genoma de aproximadamente 8.2 kb, está compuesto por tres partes: dos regiones no codificantes (5'UTR y 3'UTR) que flanquean un marco de lectura abierto (ORF) codificante de una única poliproteína. Las regiones no codificantes incluyen elementos reguladores con estructuras secundarias y terciarias complejas. El 5'UTR está compuesto por varios elementos estructurales distintos que incluyen los tramos homopoliméricos de polirribocitidilato (poli C), tres o cuatro pseudonudos (PK), el sitio Cre y el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). El extremo 3'UTR está compuesto por 90 nucleótidos de un tramo de poliadenilato (poliA) y juega un papel importante en la replicación del genoma viral (Figura 1.3).

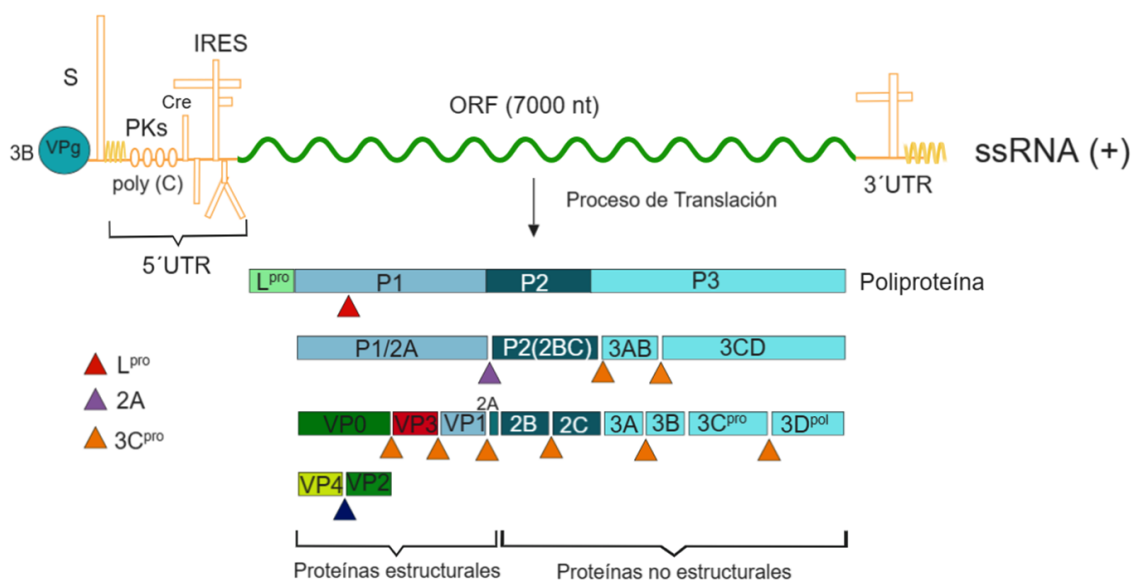


Figura 1.3. Mapa esquemático del genoma del VFA. Se muestran las proteínas codificadas y la cascada de reacciones proteolíticas que dan lugar a los productos finales. La 5'UTR incluye el fragmento S, poli (C), PKs, cre e IRES. La 3'UTR está compuesta de dos bucles y una cola de poli (A). La cadena en verde indica el ORF de RNA del genoma. Las barras debajo del genoma indican las proteínas intermedias y maduras, estructurales y no estructurales.

La poliproteína, de 2328 aminoácidos es procesada por las proteasas virales L y 3C durante el ciclo infeccioso. La lectura del RNA puede comenzar en uno de los dos codones AUG funcionales, separados por 84 nt [123]. La poliproteína está dividida en 4 regiones denominadas: L, P1, P2 y P3. La región L codifica una proteasa activa que cataliza su propio procesamiento, para codificar las proteínas Lab y Lb.

La región P1 codifica las proteínas estructurales: VP1, VP2, VP3 y VP4 que componen la cápsida del virión. La región P2 codifica las proteínas no estructurales 2A, 2B, 2C y la región P3 codifica las proteínas no estructurales 3A, 3B, 3C y 3D (Figura 1.3). Las proteasas L y 3C, además de las proteínas 2B y 2C están involucradas en la evasión de la respuesta inmune [124, 125].

El VFA fue uno de los primeros modelos virales utilizados para evidenciar experimentalmente la teoría de las cuasiespecies [126, 127], que postula que ciertas especies de virus se comportan como un conjunto de genomas relacionados pero no idénticos, sujetos a continuos procesos de variación, competición y selección. El VFA es por tanto un virus con una amplia diversidad genética producto de la alta variabilidad génica. Se ha clasificado en siete serotipos distintos (O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3 y Asia I) en función de la respuesta humoral que induce, con más de 65 subtipos y múltiples variantes antigénicas. No se da protección cruzada entre estos siete serotipos. Todos los serotipos comparten entre sí aproximadamente un 86% de similitud de aa en su genoma. La mayor variabilidad entre ellos se da en las zonas codificantes de las proteínas de la cápsida, como es el caso de la VP1, con 30-50 % de nucleótidos no conservados entre serotipos [128]. El VFA del serotipo O es el más ampliamente distribuido a nivel mundial. Más del 80 % de los brotes ocurridos hasta el momento son causados por este serotipo. Por otro lado, muestra menos diversidad antigénica que los serotipos A y SAT2, aunque el serotipo Asia-1 se considera genética y antigénicamente el menos diverso y su distribución se limita en Asia [129]. El serotipo A es antigénicamente el más diverso, con más de 32 genotipos y está cambiando más rápidamente que el serotipo O, tal como demuestra la aparición de varias cepas con distinto perfil antigénico en el Medio Oriente y en América del Sur en las últimas dos o tres décadas [130].

1.2.2. El virus de la fiebre aftosa: determinantes antigénicos y epítomos inmunogénicos

La identificación y caracterización de epítomos B y T de un patógeno es crucial para entender el mecanismo básico de la protección inmunológica, así como para la formulación de vacunas de subunidades eficientes [131]. La identificación de epítomos conservados y protectivos podría permitir un espectro más amplio de protección antigénica [132].

El virus de la Fiebre Aftosa (VFA) ha sido uno de los primeros sistemas virales empleados como modelo para el desarrollo de vacunas sintéticas, tanto recombinantes como peptídicas [133-135]. Su utilización se ha visto favorecida por la importancia de la enfermedad que produce, las limitaciones de las vacunas convencionales existentes y por tratarse de un virus sencillo estructuralmente del que se conoce la secuencia aminoacídica completa de todas sus proteínas [136], la estructura tridimensional de sus viriones [137], así como los principales sitios antigénicos [138].

La importancia del papel que desempeñan los Acs específicos frente al VFA en la protección fue demostrada originalmente por Loeffler y Frosch en 1897, al observar que se podía proteger completamente a bovinos de la infección mediante la administración pasiva de suero de animales convalecientes [114]. Se han identificado los epítomos inmunológicos responsables de esta protección

entre los bucles y láminas de las proteínas de la cápsida que se encuentran expuestos al exterior e interaccionan con Acs. En total, se han identificado 5 sitios antigénicos para el serotipo O de VFA (Figura 1.4).

En la proteína VP1, se localiza el bucle G-H, que abarca los aa 135-158 caracterizado por ser estructuralmente flexible, tener secuencia hipervariable y contener el motivo altamente conservado arginina, glicina y ácido aspártico (RGD), que constituye un sitio de unión a los receptores celulares de la familia de las integrinas [136]. En los viriones de VFA serotipo O, el Sitio 1 incluye residuos alrededor de las posiciones 140-160 dentro de este bucle G-H, correspondientes a uno de los principales determinantes antigénicos neutralizantes de VFA, (SN1 a) [138-142] y un segundo determinante (SN1 b) en el extremo carboxi-terminal de la proteína VP1, entre las posiciones 1144-1146 [143, 144].

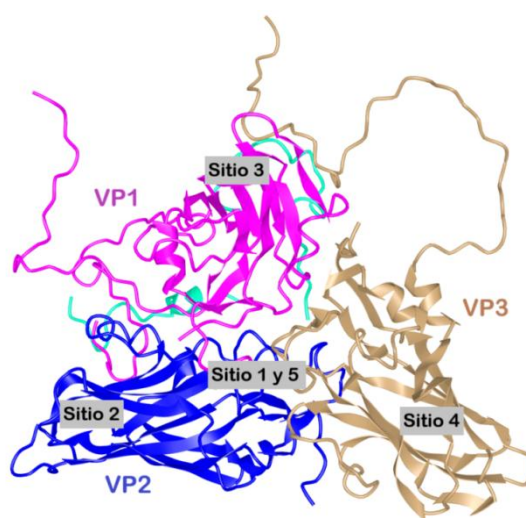


Figura 1.4. Descripción esquemática de la localización de los cinco sitios antigénicos neutralizantes del VFA. Diagrama de cintas de la estructura molecular de un protómero biológico en la cápsida de VFA. Las proteínas que conforman el protómero se indican en colores: VP1 (rosa), VP2 (azul) y VP3 (marrón). VP4 es interna. Adaptado de Mahapatra y Parida, 2018 [139].

El sitio 2 incluye los aa 70-78 y 131-134 de la proteína VP2 (bucles BC y EF), el sitio 3 abarca los residuos 40-60 de la proteína VP1 (bucle B-C) y el sitio 4 incluye los residuos 56-58 de VP3. El sitio 5 se define por una mutación específica en la posición 149 de VP1, es distinto del sitio 1 y dependiente del plegamiento del bucle G-H y de la interacción con otros residuos [140]. Además, se ha propuesto la existencia de un sexto sitio antigénico neutralizante que involucra el residuo 191 de VP2 [141].

La activación de una adecuada respuesta celular, especialmente la citotóxica, suele ser un mecanismo clave de defensa del hospedador frente a infecciones virales, incluyendo las causadas por picornavirus [142]. En el caso particular de VFA el papel de dicha respuesta no está del todo claro [143]. A pesar de ello, diversos estudios señalan la importancia de la misma frente a VFA, tradicionalmente eclipsada por el

enfoque centrado principalmente en los AcsN. En este sentido se ha demostrado que la depleción de linfocitos T CD4 en vaca reduce significativamente el título de AcsN y retrasa el cambio de isotipo de los Acs, en respuesta a la inmunización con virus inactivado [144]. Asimismo, se ha demostrado que la infección de cerdos con VFA induce respuestas CD8+ [145] e incluso que la inmunización con un adenovirus recombinante que induce respuesta citotóxica específica, en ausencia de AcsN, es capaz de reducir los signos clínicos de la infección y la viremia frente al desafío con VFA [146].

En contraste con la respuesta de Acs, que es específica para cada serotipo, la respuesta celular es en buena medida heterotípica [147-149]. Por ello, la incorporación de epítomos celulares capaces de inducir respuesta cruzada en el diseño de vacunas, puede contribuir al desarrollo de estrategias vacunales más eficaces.

Los linfocitos T, a diferencia de los linfocitos B, sólo reconocen el antígeno una vez procesado y asociado a moléculas propias del Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, denominado SLA en el cerdo) [150]. Este requerimiento introduce lo que se denomina restricción impuesta por el MHC, puesto que dentro de una población polimórfica respecto al MHC expresado por las células, diferentes individuos pueden reconocer diferentes regiones de una proteína. Esta restricción MHC es especialmente relevante en el diseño de vacunas de subunidades. Por lo tanto la selección de epítomos T debe hacerse seleccionando aquellos que puedan ser reconocidos en el contexto del mayor número posible de formas alélicas del MHC (lo que denominamos promiscuidad).

La identificación y caracterización de epítomos T cooperadores específicos de VFA comenzó con estudios en la proteína VP1 tanto en vaca como en cerdo [147, 151, 152], que contaban con la desventaja de ser secuencias con alta variabilidad entre serotipos de VFA. Más interesante a efecto de su utilización como vacunas, fue el hallazgo de epítomos T cooperadores en la proteína VP4, que presentan una elevada homología entre los diferentes serotipos de VFA [153, 154]. La búsqueda de este tipo de epítomos también se realizó en las proteínas no estructurales, dado que estas exhiben menores niveles de variabilidad entre aislados virales y serotipos. De este modo se identificaron en cerdos infectados con aislados de VFA de serotipos C y O, distintos epítomos T cooperadores inmunodominantes, promiscuos y heterotípicos, en las proteínas 3A, 3B y 3C [148]. Entre ellos se encuentra el utilizado a lo largo de esta tesis, identificado entre los aa 21-35 de la proteína 3A de VFA. La presencia de epítomos T cooperadora también se ha demostrado en otra proteína no estructural, la 3D, tanto en bovinos [155] como en porcinos [149, 156]. De hecho, la contribución de esta proteína a la respuesta inmune protectora frente al VFA se confirmó con la observación de que animales inmunizados con virus recombinantes que expresan la proteína 3D individual [149] o junto con proteínas estructurales [157], son capaces de conferir protección parcial frente a VFA, en ausencia de AcsN.

Son pocos los epítomos T citotóxicos de VFA caracterizados, en parte debido a las dificultades técnicas para establecer ensayos fiables de respuesta citotóxica para este virus [146]. El VFA es altamente citopático y, por lo tanto, las células diana experimentales para una respuesta de citotoxicidad no pueden infectarse con virus vivos. Además, el ensayo requiere la compatibilidad de MHC de clase I de los

animales que responden y las células diana lo que requiere de animales singénicos. Los epítomos T CD8 citotóxicos identificados hasta ahora se limitan a los identificados en ratón [158, 159], bovino [160] y cerdo [159]. La identificación tradicional de epítomos ha dependido completamente de las técnicas experimentales, siendo costosas y lentas. Hoy en día se han desarrollado e implementado métodos de predicción de epítomos que facilitan la identificación de epítomos y disminuyen la carga experimental asociada con ellos [131, 161]. Así se han identificado más epítomos citotóxicos de cerdo, con afinidad por haplotipos de SLA-I comúnmente expresados en razas comerciales porcinas [162], pero cuyo reconocimiento por células de animales infectados o vacunados frente a VFA aún no ha sido determinado.

1.2.3. Epidemiología de la FA: distribución actual de la enfermedad

La enfermedad de la Fiebre Aftosa está distribuida por todo el mundo y continúa siendo endémica en muchas regiones, incluyendo partes de África, Oriente Medio, Asia y Sudamérica [163]. Se subdivide en siete grupos o “pools” de los principales serotipos que circulan en cada región (Figura 1.5).



Figura 1.5. Mapa esquemático de la distribución actual de la Enfermedad de la Fiebre Aftosa y del VFA. En verde oscuro países libres de la enfermedad sin vacunación. En verde claro países libres de la enfermedad con vacunación. Los Grupos (Pools) 1 (rojo), 2 (naranja) y 3 (celeste) están compuestos por los serotipos A, Asia I y O. Los Grupos 4 y 6 (amarillo y morado respectivamente) están compuestos por los serotipos O, A, SAT1, 2 y 3. El Grupo 5 (lila) por los serotipos O, A, SAT1 y 2. El Grupo 7 (negro) por los serotipos O y A. Adaptado de: [164] Global Foot-and-Mouth Disease Situation FAO, febrero 2018 y <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/official-disease-status/fmd/en-fmd-carte/>).

Los programas de vacunación se basan en gran medida en la cobertura de cepas virales dentro de cada grupo (pool). Sin embargo, en los últimos años ha habido un importante movimiento de linajes virales entre grupos, como en el caso del serotipo O-India 2001d que se extendió más allá del subcontinente

indio hacia el norte de África y el sudeste asiático [165-167]. En países como Estados Unidos, Reino Unido, Japón, entre otros, la erradicación de la fiebre aftosa se logró mediante programas coordinados de vacunación regular masiva, control del movimiento de animales, prácticas de cuarentena y estrictas medidas zoonosanitarias [4]. Por tanto, factores como la globalización del comercio, la migración de personas y la carencia del control de movimiento animal transfronterizo de algunos países, juegan un papel importante en la actual epidemiología de VFA [139].

1.2.4. Vacunas contra la FA

1.2.4.1. Vacunas en uso

Ante una situación de emergencia, la enfermedad de la Fiebre Aftosa suele ser controlada por sacrificio sanitario de animales expuestos y/o infectados, o por vacunación. En países libres de la enfermedad donde surgen brotes, el sacrificio ha sido normalmente la acción seleccionada puesto que bajo las regulaciones actuales de la OIE, la presencia de animales vacunados les obliga a perder su estatus de país libre y por tanto, el acceso a los mercados de exportación [115]. En países donde la fiebre aftosa es endémica, el control de la enfermedad se basa en la vacunación periódica con vacunas elaboradas a partir del estudio de las cepas circulantes en cada territorio.

Las vacunas contra FA disponibles en el mercado consisten en preparados sero-específicos de viriones completos inactivados con etilenimina binaria (BEI), parcialmente purificado de las proteínas NS virales y formulado con adyuvantes generalmente oleosos, como vacuna monovalente o multivalente [134, 168, 169]. La purificación de la vacuna para eliminar las proteínas no estructurales se realiza por diversos procedimientos, tales como precipitación con polietilenglicol, ultrafiltración y cromatografía; tiene como objetivo facilitar la diferenciación entre animales vacunados (sin Acs frente a proteínas no estructurales) e infectados (con Acs frente a proteínas no estructurales). Sin embargo se han descrito falsos positivos, producto de purificaciones ineficientes [114, 170].

Generalmente, la carga de antígeno varía según el serotipo y el propósito de la vacuna (entre 1 y 10 µg de viriones completos). Por ejemplo, las vacunas de VFA frente a serotipo O son menos inmunogénicas, por lo que requieren de mayor carga viral por dosis de vacuna que las vacunas frente a serotipos A, C o Asia1 [114]. La inclusión de adyuvantes en las vacunas convencionales es esencial para la protección frente VFA. Se utilizan comúnmente como adyuvantes el Montanide® ISA 201 ó 206 (Seppic Inc, Francia) preparadas como emulsiones de agua en aceite o formulaciones a base de aluminio (alum / saponina) [171].

Por otra parte, las denominadas vacunas de emergencia, de alta potencia, contienen también más carga de antígeno, ya que requieren de al menos seis dosis protectoras 50% (6PD50) por dosis. Suele ser frecuente la administración de una combinación de varios serotipos y cepas, para tratar de conferir protección frente a los múltiples serotipos que circulan simultáneamente en muchas regiones. No

obstante, la vacunación multivalente no tiene un efecto amplificador de la protección conferida por cada vacuna individualmente [172, 173]. Así mismo, la efectividad de las vacunas convencionales en cerdos ha sido debatida puesto que la vacunación profiláctica masiva no indujo una respuesta inmune adecuada ni previno de la propagación generalizada durante el brote de VFA de Corea en el 2014 [174-176].

A pesar de su eficacia, las vacunas actuales contra FA presentan varias limitaciones e inconvenientes muy importantes, algunos de los cuales se describen a continuación: 1) para prevenir el escape del virus se requiere de instalaciones de alta contención para la producción de las vacunas; a pesar de todas las medidas de seguridad, existe un claro riesgo de escape de las plantas de producción [177]; 2) muchas de las preparaciones usadas para la vacuna se concentran a partir de sobrenadantes de células infectadas con VFA y dependiendo del tipo de manufacturación, pueden contener cantidades significativas de proteínas no estructurales virales como contaminantes, lo que impide distinguir con facilidad los animales vacunados de los infectados; 3) la inactivación del virus puede ser incompleta, con lo que la vacuna puede ser una fuente de infección potencial; 4) la vacuna no induce una rápida protección frente al desafío por inoculación directa o contacto directo; por lo tanto, se presenta una ventana de susceptibilidad de los animales vacunados antes de la inducción de la respuesta inmune adaptativa; 5) debido a la existencia de múltiples variantes antigénicas circulantes de VFA, a la ausencia de reacción cruzada entre los diferentes serotipos, y a la protección incompleta entre subtipos, es necesario utilizar vacunas derivadas de diferentes serotipos y variantes que se deben actualizar dependiendo de la zona geográfica, aumentando los costos de la producción y los riesgos derivados de una falta de protección completa; 6) la vacuna es inestable a una temperatura de 2-8 °C [178, 179] y mucho más a temperaturas mayores. La causa de esta inestabilidad se debe a la termolabilidad intrínseca de los viriones de VFA, que se disocian fácilmente a pentámeros, los cuales presentan una inmunogenicidad severamente reducida [179, 180].

Por lo tanto, las vacunas requieren de un almacenaje en nitrógeno líquido y requieren del establecimiento de una costosa cadena de frío desde el punto de fabricación hasta al punto de aplicación. El mantenimiento de esta cadena de frío en muchos de los países en los que la FA es endémica es complicado debido a la falta de infraestructura adecuada y a las condiciones climatológicas desfavorables; la pérdida de inmunogenicidad tras la ruptura de la cadena de frío no es detectada, y la vacunación resulta ineficaz en tales casos [170, 178, 181].

1.2.4.2. Otras vacunas en desarrollo

Debido a los inconvenientes arriba detallados, de las vacunas comerciales actualmente disponibles, su uso no está permitido en muchas zonas geográficas como la UE, América del Norte, Centro América y Australia. Sin embargo como también se ha mencionado, la distribución de la FA es muy amplia y por tanto el riesgo de entrada de la enfermedad en esas zonas es grande. Con objeto de disponer de medios de prevención de la FA que carezcan de los inconvenientes de las vacunas inactivadas, se han exportado

distintas estrategias para desarrollar nuevas vacunas capaces de controlar esta enfermedad eficientemente y sin riesgos.

Robinson et al., 2016 [182] identifica una serie de prioridades en la investigación de las vacunas para VFA, que deben ser consideradas: 1) Desarrollar estrategias vacunales que induzcan respuesta inmune sistémica así como de mucosa en especies susceptibles, 2) Desarrollar formulaciones vacunales efectivas en animales neonatos con o sin inmunidad materna. 3) Investigar las características de seguridad y eficacia de las nuevas plataformas atenuadas de vacuna, 4) Comprender y superar la barrera de la protección de vacunas específicas de serotipo y subtipo, 5) Diseño e ingeniería de antígenos de VFA de segunda generación, 6) Mejoras en el tiempo de desarrollo y la duración de la inmunidad de las vacunas actuales y de próxima generación, 7) Desarrollar vacunas frente VFA de nueva generación que prevengan la persistencia del virus y 8) Invertir en el desarrollo de nuevos adyuvantes para mejorar la eficacia y la seguridad de las vacunas actuales. Recientemente, en un análisis sobre las vacunas recombinantes para VFA [32] concluyen que dado que la FA es un problema mundial con diferentes escenarios y necesidades específicas, se deben desarrollar estrategias vacunales y zoonosanitarias adaptadas para cada situación específica.

Hasta el momento se han evaluado una serie de nuevas vacunas experimentales contra la FA que tratan de minimizar alguno(s) de los problemas mencionados. Una de las estrategias estudiadas se centra en el desarrollo de variantes de VFA atenuados. La delección o mutación de regiones del genoma viral que están implicadas en el "shut off" traduccional de la célula infectada, como la proteína líder (Lpro), han dado lugar a prototipos vacunales evaluados con éxito en vaca y cerdo [183]. Recientemente se ha descrito la generación de VFA atenuados, generados por mutaciones puntuales que alteran la fidelidad de la replicación viral [184, 185]. No obstante, este tipo de estrategias tienen como principal inconveniente el riesgo de reversión a fenotipos virulentos o la incapacidad para inducir una buena respuesta inmune protectora en el animal.

Otra estrategia explorada para el desarrollo de nuevas vacunas se basa en la expresión de distintas proteínas de VFA usando vectores virales recombinantes como el virus vaccinia, el virus de la viruela aviar, el de la enfermedad de Aujeszki o el virus del bosque de Semliki [186-188]. Una de estas estrategias que está resultando más exitosa se basa en la utilización del adenovirus humano tipo 5 como vector viral de las proteínas de VFA. En los Estados Unidos se ha autorizado la licencia (condicionada a la declaración de brotes de VFA) de una vacuna frente a VFA consistente en un adenovirus recombinante humano que expresa las proteínas de la cápsida del VFA A24 [103]. Al tratarse de un virus es defectivo, solo realiza una ronda de replicación única, produciendo cápsidas vacías de VFA que inducen una respuesta inmune protectora frente al desafío viral tanto en cerdos como en vacas [189-193]. Uno de los inconvenientes de esta estrategia es la necesidad de inmunización con dosis muy elevadas del adenovirus recombinante [169]. Sin embargo recientemente se ha demostrado que es posible reducir la

dosís mediante una adecuada seleccióñ del adyuvante utilizado, en este caso con ENABL® [194]. La estrategia basada en adenovirus recombinantes se ha extendido al desarrollo de vacunas frente a otros serotipos de VFA, como es el O, consiguiendo rebajar las dosís de inmunizacióñ mediante la incorporacióñ de estimuladores de la respuesta innata [195-198]. Por otra parte, este abordaje basado en el uso de vectores virales permite el desarrollo de vacunas multivirales, como la estrategia basada en un virus vivo atenuado recombinante derivado del Virus de la Peste de Pequeños Rumiantes (PPRV), que expresa el gen que codifica la proteína VP1 de VFA [199]. Las ovejas inmunizadas con una úñica dosís de este virus recombinante desarrollan AcsN frente a ambos virus y resultan protegidas tras el desafío viral tanto con VFA como con PPRV.

Las vacunas basadas en cápsidas vacías del propio VFA son una alternativa interesante, ya que mantienen la especificidad antigénica e inmunogénica de los viriones inactivados utilizados en la vacuna convencional, pero evitan la necesidad de manipular virus infeccioso, el riesgo de escape de virus o de infección provocada por una inadecuada inactivacióñ. Se han generado VLPs del serotipo A, O y SAT2 [200, 201], aunque su síntesis ha resultado en general muy ineficaz, dando lugar a una baja producción de VLPs de VFA. Una razón es la toxicidad de la proteasa 3C requerida para el procesamiento de P1 [202]. Esto pudo revertirse, utilizando una secuencia de la proteasa 3C mutada (L127P) como también mediante la utilización de una proteasa derivada de otros virus, bien tolerada por las bacterias *E.coli*, que mejora la producción de VLPs de VFA [203, 204]. Otro posible inconveniente es la inestabilidad térmica de estas VLPs, incluso mayor que la de los viriones completos [205]. Para tratar de solventar este inconveniente se está trabajando en el diseño de variantes termoestables de VFA. Por una parte se han identificado dos sustituciones de aa, en la proteína VP1 (N17D) y en la proteína VP2 (H145Y) que dan lugar a viriones más resistentes a pH ácidos y a la disociacióñ de las partículas a 4°C, sin perder capacidad inmunogénica [206, 207]. También se han identificado algunos de los determinantes estructurales que son la base de la termolabilidad de VFA. En particular se ha demostrado que repulsiones electroestáticas entre las subunidades de la cápsida median la sensibilidad de los viriones a la disociacióñ térmica [179].

En general, las vacunas de subunidades tienen ventajas sobre las vacunas de virus inactivados tradicionales en términos de seguridad (no involucran virus infecciosos), estabilidad y potencial de ser producidas a gran escala a costes asequibles. El VFA es uno de los primeros virus utilizados como modelo para el desarrollo de vacunas de subunidades. El desarrollo de VLPs quiméricas (vacuna de subunidades) como estrategia de vacunacióñ frente a VFA comenzó conjugando un péptido sintético que reproducía un sitio neutralizante de VFA localizado en la proteína VP1, a las partículas del virus de la hepatitis B (HBV) [40]. La inmunizacióñ de cobayas, vacas y cerdos con estas VLPs quiméricas indujo AcsN frente a VFA y confirió protección frente al desafío viral.

Otro abordaje de vacunas de subunidades muy prometedor, para las que el VFA también ha servido de modelo, son las vacunas basadas en péptidos sintéticos. Nuestro laboratorio, en colaboración con los grupos de los doctores F. Sobrino y D. Andreu, ha trabajado en el diseño de vacunas peptídicas frente a VFA basadas en la síntesis de construcciones dendriméricas (péptidos ramificados). En dichos estudios se demostró que la asociación de cuatro copias de un epítipo antigénico B, del serotipo C de VFA, junto con una única copia de un epítipo T era capaz de activar específicamente las células T e inducir títulos altos de AcsN y una respuesta IgA, local y sistémica, confiriendo protección completa frente al desafío con VFA en un hospedador natural [208]. Esta protección fue superior a la lograda con sus contrapartes lineales, revelando la ventaja de la presentación múltiple del epítipo B y la importancia para la inmunogenicidad de la inclusión de un epítipo T orientado de forma óptima [209]. Esta estrategia de péptidos dendriméricos se extendió posteriormente a VFA de serotipo O, confirmando la inmunogenicidad y el potencial protector de esta estrategia vacunal [210, 211].

Por último, es importante destacar la relevancia del desarrollo de adyuvantes que permitan mejorar la respuesta inducida por las estrategias vacunales desarrolladas, en especial de las vacunas de subunidades [168]. El uso de ligandos de receptores *Toll-like* (TLR) es una de las estrategias más usadas para mejorar la respuesta de una vacuna. Así, el uso de poli I:C (ligando de TLR3) incrementa la respuesta celular y humoral, y potencia la protección en cerdos inmunizado con una vacuna de subunidades multiepitópica [212]. La utilización de otro ligando de TLR3, el poly ICLC (poli lisina y carboximetilcelulosa), ha permitido reducir 80 veces la dosis de una vacuna basada en un adenovirus recombinante que expresa las proteínas de la cápsida de VFA, requerida para inducir protección [197]. También se ha demostrado que RNA sintético de doble cadena, que mimetiza un dominio estructural del extremo 3' no codificantes de VFA, es capaz de mejorar la respuesta inmune y la protección conferida por viriones completos de VFA inactivados [213, 214], potenciando la respuesta inmune innata mediante la activación del factor de regulación de IFN 3 (IRF3) [215, 216].

Con estos antecedentes, en esta tesis doctoral hemos explorado el potencial como vacunas frente a la FA de la VLP quimérica de RHDV que expresa epítopos B y T del VFA, evaluando su inmunogenicidad y su capacidad de protección *in vivo*, en el modelo murino y porcino. Las ventajas de una vacuna basada en este abordaje incluyen su seguridad, fácil producción y escalado, flexibilidad para adaptarse a las variantes virales circulantes y la posibilidad de desarrollar vacunas multivalentes.

Capítulo 2

Objetivos



El objetivo general de esta tesis doctoral es estudiar el desarrollo de una vacuna eficaz y segura frente a la infección por el VFA basada en pseudopartículas virales (VLPs). Como tal, constituye la continuación de líneas de investigación ya establecidas en el laboratorio dedicadas tanto al estudio de la respuesta inmune durante las vacunaciones frente a VFA en el modelo murino y porcino, como al desarrollo de las VLPs derivadas de Virus de la Enfermedad Hemorrágica del conejo (RHDV) como agente vacunal frente a diversas enfermedades en el ámbito de la sanidad animal.

Los objetivos específicos de esta tesis han sido:

1. Diseño y generación de una colección de VLPs quiméricas basadas en RHDV que presentan epítomos B y T de VFA previamente caracterizados.
2. Evaluación de la inmunogenicidad y protección frente a la infección por el VFA conferida por las construcciones quiméricas RHDV-VFA en modelos de estudio *in vivo* murino y porcino.
3. Generación de un vector adenoviral con la capacidad de inducir una respuesta celular específica *in vivo* para potenciar la eficacia de la vacunación con VLPs quiméricas RHDV-VFA.
4. Adaptación del uso de VLPs basadas en RHDV para la presentación eficaz y simultánea de epítomos derivados de distintos serotipos del VFA.

Capítulo 3

Materiales y Métodos



3.1. Materiales

3.1.1. Virus

En esta tesis doctoral se emplearon los siguientes virus:

Tabla 3.1. Descripción de las cepas de VFA utilizados

Serotipo	Linaje	Cepa	Topotipo	Referencia
O	Panasia	UKG/35/2001	ME-SA	[217]
A	A22	A22 Iraq 24/64	Asia	[218]
C	-	C-s8c1	Euro-SA	[219]

Las VLPs utilizadas en esta tesis doctoral fueron generadas mediante el sistema de expresión de baculovirus recombinante (rBV). Todos los rBV se obtuvieron por co-transfección del DNA plásmidico de cada una de las construcciones (Tabla 3.2) con el genoma baculoviral linearizado proporcionado en el kit flash BACULTRA (Oxford expression technologies, UK), en células de insecto H5 como se describirá más adelante en el [apartado 3.2.7](#).

Tabla 3.2. Descripción de los baculovirus recombinantes (rBV) generados

Nombre del rBV	Nombre de la VLP
rBV AH104	N-T
rBV AH105	L-B
rBV AH106	N-BT
rBV AH107	L-BT
rBV AH108	L-B/N-T
rBV GR2	L-B/N-T2
rBV GR11	L2-B
rBV GR16	L-B A22 IRQ
rBV GR19	L-B O UK/L2-B A22 IRQ
rBV GR24	L-B C s8c1

El nombre de la VLP hace referencia al epítipo exógeno incorporado en la VP60. N: región N terminal de VP60 (entre los aa 2 y 3); L: sitio de inserción que corresponde con un bucle 1 en el subdominio P2, (entre los aa 306-307); L2: sitio de inserción que corresponde con un bucle 2 en el subdominio P2 (entre los aa 342-343); T: epítipo T de la proteína no estructural 3A de FMDV O UK/01; T2: versión del epítipo T con elongación de la secuencia original por el extremo N terminal; B: epítipo B correspondiente al sitio neutralizante 1 de la proteína estructural VP1 de los cepas de VFA correspondiente.

Los adenovirus recombinantes (rAdV) utilizados en esta tesis doctoral se generaron mediante el sistema Adeno-X™ Adenoviral system 3 (Clontech®). Todos los rAdV (Tabla 3.3) se obtuvieron mediante transfección de los plásmidos correspondientes en células 293T como se describe más adelante en el [apartado 3.2.11](#).

Tabla 3.3. Descripción de los adenovirus utilizados

Nombre del rAdV generado	Proteína expresada
rAdV 3D	3D VFA
rAdV 3D KAKA	3D KAKA VFA
rAdV LacZ	LacZ

rAdV: adenovirus recombinante; 3D: proteína no estructural de VFA, 3D KAKA: doble mutante de la polimerasa del VFA con cambios en la región N terminal, con sustitución de los aminoácidos K por A en las posiciones 18 y 20 [220].

3.1.2. Células

En el desarrollo de esta tesis fueron empleadas líneas celulares establecidas, células primarias y células procariotas que se describen en la siguiente tabla:

Tabla 3.4. Descripción de las células utilizadas

Líneas celulares establecidas		
Nombre	Origen	Utilización
IBRS	Célula epitelial porcina, ATCC® CRL-1835™	Propagación y titulación de VFA, ensayos de seroneutralización
BHK-21	Células de riñón de hámster, ATCC ®CCL-10™	Propagación y titulación de VFA, ensayos de seroneutralización
293T	Células epiteliales humanas, ATCC® CRL-3216	Preparación, Obtención y propagación de los adenovirus recombinantes
High-Five (H5)	Línea celular derivada de larvas de insecto <i>Trichoplusia ni</i> [221].	Preparación y propagación de los baculovirus recombinantes; expresión de proteína recombinante (VLPs)
Células primarias		
Nombre	Origen	Utilización
CMSP	Células mononucleares obtenidas a partir de sangre periférica de cerdo	Ensayos de ELISPOT IFN γ , linfoproliferación y citometría de flujo
Esplenocitos murinos	Células mononucleares obtenidas a partir de bazo de ratones	Ensayos de ELISPOT IFN γ , linfoproliferación y citometría de flujo
Células procariotas		
Nombre	Origen /Genotipo	Utilización
NEB 5-alphaE. coli	NEB® #C2987I fhuA2 Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	transformación y purificación de ADNs plasmídicos para la obtención de VLPS recombinantes
E. coli HST08	Clontech® #636766 F-, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ 80d lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF) U169, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Δ mcrA, λ	transformación y purificación de ADN plasmídicos para la obtención de rAdV

Todas las líneas celulares establecidas antes descritas proceden del banco de células del CISA-INIA, con excepción de las células 293T, cedidas por el laboratorio del Dr. Esteban Domingo, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO, CSIC).

3.1.3. Animales

Para valorar la inmunogenicidad de las VLPs quiméricas presentadoras de epítomos del VFA se realizaron ensayos *in vivo* en el modelo murino. Para ello se utilizaron hembras de las cepas Swiss ICR (CD-1®) o C57BL/6 de 7-8 semanas de edad, suministradas por la empresa Harlan. Para los ensayos en el modelo porcino se emplearon hembras de raza Landrace x Large White de 7-8 semanas de edad, suministradas por la casa comercial Agropardal.

3.1.4. Oligonucleótidos

En este apartado se muestran los oligonucleótidos utilizados en esta tesis doctoral.

Tabla 3.5. Lista de oligonucleótidos utilizados

Oligonucleótidos para clonajes	
Nombre	Secuencia de nucleótidos
AH104F	5'-GATGGTGCACGACTCCATCAAGGGATCCAAAGCCCGCACAGCACCG3'
AH104R	5'-CCCTCAAAGAATTCAATTGCTGCGGATCCCATATTTATAGATCTTCTAGGATCGATCCGTATTTATAGGTTTTTTTATTACAAAAC3'
AH105F	5'-ATTGGCCCCAAAAGGCGGCAAGAACGGGATCCAAACGCAACCAACGTGCTT3'
AH105R	5'-ACTTGCAGGTACCTCTCACATTGGTCACGGGGGATCCAGGGTAACTTGC3'
AH106F	5'-AGTATTGGCCCCAAAAGGCGGCAAGAACGGCAGCAATTGAATTCTTTGAG3'
AH106R	5'-TGCAGGTACCTCTCACATTGGTCACGGGGGATCCCATATTTATAGATCTTC3'
AH107F	5'-GATGGTGCACGACTCCATCAAGGGATCCAAACGCAACCAAC3'
AH107R	5'-CCCTCAAAGAATTCAATTGCTGCCGTTCTTGCCGCTTTTG3'
AH108F	5'-GATGGTGCACGACTCCATCAAGGGATCCAAAGCCCGCACAGCGCG3'
AH108R	5'-CCCTCAAAGAATTCAATTGCTGCGGATCCCATATTTATAGATCTTCTAGGATCGATCCGTATTTATAGGTTTTTTTATTACAAAAC3'
GR2F	5'-TCTCATCCAACAGGGATCCAAAGCCCGCACAC3'
GR2R	5'-GGCCGGAGCTCCTCCTTGATGGAGTCGTGCACC3'
GR4 F	5'-AGGTGTCGTGGGATCACCATGGGGTTGATCGTTGATACCAGAGATGTG3'
GR4 R	5'-ATGGTCTAGAGAATTTTATGCGTCGCCGCACACGGCGTTACCC3'
GR11F	5'-GGTGCTGGCCAGAAAGGCCCGCCGACCGGCTCCCCCTTCAACGGACCAGGA3'
GR11R	5'-TGCAGGTGCGCGGCACGTTGGTCACGGGGGAGCCACGAAGGACATATCAGGG3'
GR16F	5'-CCTCTCGCGGCGAGGGTCGCGGCTCAGCTTCTGGATCCAACGCAACTAAC3'
GR16R	5'-CCCTAGGTGCGCCCGTCTGCCGTACCGGATCCTGGGTAGCTTGACAGATCC3'
GR19F	5'-GCAGGTGCTGGCCAGAAAGGCCCGCCGACCGGATCCAACGCAACTAAC3'
GR19R	5'-AGGTGCGCGGCACGTTGGTCACGGGGGAGCCTGGGTAGCTTGACAGATCC3'
GR24 F	5'-CTGGCCACCTGACCACACCCACGCCCCGACCTGCCCGGATCCAACGCAACTAAC3'
GR24 R	5'-GTCGCCGCGGGCGAGGCGGTGTAGGTGGTGGTGGAGCCTGGGTAGCTTGACAGATCC3'
Infusion 3D F	5'-GTAACATAACGGTCATGGGGTTGATCGTTGATACCAGAG3'
Infusion 3D R	5'-ATTACCTCTTCTCCTTATGCGTCGCCGCACAC3'

Oligonucleótidos para secuenciación	
Nombre	Secuencia de nucleótidos
BAC R	5'-ACCATCTCGCAAATAAATAAGTATT3'
BAC F	5'-GCGCTAGATTCTGTGCGTTGT3'
360 F	5'-GTTTCATCGTGGCTGGATCTGG3'
851 F	5'-CCTACGGCTGGAGTTCGCCCCG3'
3D VFA 378 F	5'-GAAACGCCGCGGTGCACTTATC3'
3D VFA F	5'-TAAATTTCTCTAGACCATTCG3'
3D VFA R	5'-GGTGATCCACGACACCT3'
Pcmv vector 3'F	5'-TGTCACACCACAGAAGTAAGTTCC3'
Universal vector 5'F	5'-TAGTGTGGCGGAAGTGTGATGTTGC3'
VP1 VFA F	5'-TACAGGGATGGGTTTGCCTG3'
VP1 VFA R	5'-TTCACCTCAGTGGCCAGTTC3'

3.1.5. Péptidos

En este apartado se muestra una tabla con las secuencias aminoacídicas de los péptidos empleados en esta tesis doctoral. Todos los péptidos descritos se suministraron liofilizados y se resuspendieron en agua a una concentración de 10 µg/µl. Estos péptidos se sintetizaron utilizando una modificación del método de síntesis en fase sólida [222] en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Pompeu Fabra, Barcelona, en el laboratorio del Dr. David Andreu.

Tabla 3.6. Descripción de los péptidos B diseñados

Descripción de los péptidos B					
Nombre	Cepa	Proteína viral de VFA	Posiciones de los aa	Aminoácidos	Uso
B	O UKG /35/01	VP1	140-158	PVTNVRGDLQVLAQKAART	Se utilizaron en ELISAs, como inmunógenos y como antígenos en la estimulación <i>in vitro</i>
B A22 IRQ	A22 Iraq 24/64	VP1	140-159	GTGRRGDLGPLAARVAAQLP	
BC s8c1	C-s8c1	VP1	133-156	TTYTASARGDLAHLTTTHARHLP	
Descripción de los péptidos T					
Nombre	Cepa	Proteína viral de VFA	Posiciones de los aa	Aminoácidos	Uso
T	C-s8c1	3A	21-35	AAIEFFEGMVHDSIK	Estimulación <i>in vitro</i> de la respuesta celular
T2			21-44	AAIEFFEGMVHDSIKEELRPLIQQ	

La RNA polimerasa del VFA (proteína 3D) recombinante purificada [223] fue cedidas generosamente por el laboratorio del Dr. E. Domingo.

3.1.6. Anticuerpos

Tabla 3.7. Descripción de los Acs utilizados

Anticuerpos primarios		
Nombre	Referencia	Marcador/proteína reconocida
IFN γ -PE, murino Clon: REA638	Miltenyi 130-117-502	IFN γ
IFN γ -PE Murino Anti-Cerdo Clon P2G10	BD-559812	IFN γ porcino
IFN γ Anticuerpo Murino ELISPOT Captura	BD-51-2525KZ	IFN γ murino
IFN γ Anticuerpo Murino ELISPOT Detección	BD-51-1818KA	IFN γ murino-Biotina
IFN γ Murino Anti-cerdo Clon P2G10	BD-559961	IFN γ porcino
IFN γ Biotina Murino Anti-cerdo Clon P2C11	BD-559958	IFN γ porcino-Biotina
Anti VP60 Mab 2E7 y 1C9	Bárcena et al 2015 [20]	VP60 y bucle L de VP60
Anti VP1 Mab SD6	Mateu et al 1990 [224]	VP1 de serotipo C de VFA
Anti 3D Mab 3F12	Arias et al 2005 [225]	3D VFA
Anticuerpos secundarios		
Nombre	Referencia	Marcador/proteína reconocida
Cabra anti-IgG murino HRP Anticuerpo conjugado	Invitrogen # 62-6520	IgG murino
Proteína A-HRP Anticuerpo conjugado	Invitrogen #101123	IgG porcino
Cabra anti-IgG1 murino HRP Anticuerpo conjugado	BethilA90-105P	IgG1 murino
Cabra anti-IgG2a murino HRP Anticuerpo conjugado	BethilA90-107P	IgG2a murino
Cabra anti-IgG2b murino HRP Anticuerpo conjugado	BethilA90-109P	IgG2b murino
Cabra anti-IgA murino HRP Anticuerpo conjugado	BethilA90-103P	IgA murino
Ratón anti IgG1 porcino clon K139 3C8	Bio-Rad MCA635GA	IgG1 porcino
Ratón anti IgG2 porcino clon K68 Ig2	Bio-Rad MCA636GA	IgG2 porcino
Ratón anti IgA porcino clon K61 1B4	Bio-Rad MCA638GA	IgA porcino
Streptavidina HRP	BD-557630	biotina

3.1.7. Isótopos radioactivos y mitógenos

Tabla 3.8. Descripción de isótopos radioactivos y mitógenos empleados

Nombre	Referencia	Uso
Fitoheماغلوتینina M PHA-M	SIGMAL8902-5MG	Mitógeno inespecífico como control positivo en ELISPOT
Concanavalina-A (Con-A)	Amershan Bioscience 17-0450-01	Mitógeno inespecífico como control positivo en ensayo de linfoproliferación
[³ H]Timidina	Perkin Elmer NET027A005MC	Se empleó para marcar el DNA celular en los ensayos de linfoproliferación

3.1.8. Medios, tampones y sustratos

En esta tesis doctoral se utilizaron los siguientes tampones y soluciones.

Tabla 3.9. Descripción de medios de cultivo, búferes y sustratos utilizados

Nombre	Composición
DMEM completo	DMEM con 4,5 g/l glucosa (#LONZ12-614F/12), 100 U/ml penicilina/streptomicina (Lonza733-1809), 2mM Glutamax (35050061, Gibco), 0.1 nM aminoácidos no esenciales (Gibco11140-035)
MEM Eagle with Earle's BSS (2X)	MEM (Lonza™ 12668E), 100 U/ml penicilina/streptomicina (Lonza733-1809), 4 mM L-glutamina (25030081Gibco), 0.1 nM aminoácidos no esenciales (Gibco 11140-035)
TNM-FH completo	TNM-FH (Sigma AldrichT3285), 100 U/ml penicilina/streptomicina (Lonza733-1809), 4 mM de L-glutamina (25030081Gibco), 0.1 nM aminoácidos no esenciales (Gibco 11140-035) y 10 U/ml de nistatina (Sigma-Aldrich, N1638)
RPMI completo	Medio RPMI 1640 BioWhittaker (Lonza733-1690), 100 U/ml penicilina/streptomicina (Lonza 733-1809), 4 mM de L-glutamina (25030081 Gibco), 50 µM de β-Mercaptoetanol (Gibco 313350-010) y 0.02M de Hepes (Sigma H0887)
Grace's Insect	Medio Grace's con L-glutamina y bicarbonato de sodio (Sigma G8142)
Medio para plaques	EMEM 2X (Lonza) suplementado con 100 U/ml penicilina/streptomicina (Lonza 733-1809), 4 mM de L-glutamina (#LONZ12-614F/12), 0.1 nM aminoácidos no esenciales (Gibco 11140-035), 0.65% agarosa MP(Roche, 11388991001), 0.1 mg/ml DEAE-Dextrano (ThermoFisher scientific D9885-10G) y 1% SFB
Solución de fijación	10% formaldehído (H7501128)
Solución de tinción con Cristal violeta	PBS+ 2% de formaldehído al 37% + 20g/l Cristal violeta
Solución de tinción con acetato de uranilo	acetato de uranilo al 2% (p/v)
SFB	Suero fetal bovino F7524 (Sigma)
SFB Linfos	Suero fetal bovino (Sigma) descomplementado (30 min a 65°C) y comprobado previamente que no estimula las células primarias.
LB (Luria-Bertani)	10 g/l Caseína peptona, 5g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl pH 7,2
LB Agar (Miller)	10 g/l Caseína peptona, 5g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl, 15g/l Agar pH 7,2
SOC	12 g/l Bactotriptona, 24g/l extracto de levadura, 0.5 g/l NaCl, 4ml glicerol/l, 2.5 mM KCl, 2 mM MgCl ₂
TAE	90 mM Tris pH 8, 89 mM ácido acético, 2 mM EDTA
PBS	140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH ₂ PO ₄ y 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4

PBS+EDTA	140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH ₂ PO ₄ y 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 0.2 M EDTA, pH 7,4
PBS-S	140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH ₂ PO ₄ y 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 10% SFB para linfos pH 7,4
PBS-T	140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH ₂ PO ₄ y 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 0.05% de Tween-20 (Sigma P1379), pH 7,4
Solución de bloqueo	PBS-T con 5% leche desnatada (p / v)
Solución de conjugado	PBS-T y 3% leche desnatada (p / v)
Solución de frenado	Ácido sulfúrico, suministrado por Merck (Ref. K29161131), se empleó a una concentración de 1.8N y 3N, como solución de frenado del sustrato TMB y OPD respectivamente
PBS-V	176 mM NaH ₂ PO ₄ , 24 mM Na ₂ HPO ₄ y 0.1M NaCl, pH 6,0
Tampón de carga	5% (v/v) β-mercaptoetanol, 2% (p/v) dodecil sulfato sódico (SDS), 10%(v/v) glicerol, 80 mM Tris-HCl (pH 6.8) y 0.01% (p/v) azul de bromofenol
Solución de transferencia	25 mM Tris, 192 mM glicina y 10%metanol
Tampón carbonato/bicarbonato	15 mM CO ₃ Na ₂ y 35 mM CO ₃ HNa, pH 9,6.
Tampón citrato-fosfato	25 mM C ₆ H ₈ O ₇ y 50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 5,0
Solución de lisis	0.83 % NH ₄ Cl
Buffer HBS	20 mM Hepes, 0.15 M NaCl, pH 7.8
Buffer TD	137mM NaCl, 5.1mM KCl, 700mM Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O, 25mM Tris pH 7.4
Tetramethyl Benzidine (TMB)	Invitrogen00-4201-56
Sustrato para ELISA con OPD	4 mg/ml OPD (P1063, Sigma)+ 0.08% H ₂ O ₂ [30%] solubilizado en tampón citrato-fosfato 0.05M a pH 5.0
3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC)	BD Biosciences 551951
Perm/Wash Buffer	BD Biosciences 554723
Histopaque®-1077	SIGMA (10771) solución estéril de polisucrosa y diatrizoato de sodio, ajustada a una densidad de 1.077 g / ml. para la recuperación de linfocitos viables y otras células mononucleares de sangre periférica
Solución 30% Acrylamide/Bis, 29:1	BIO RAD 161-0156
Agarosa D1 EEO	PRONADISA 8019
Solución de transfección con cloruro cálcico (CaCl₂)	Solución al 2.5M de CaCl ₂
Medio de congelación de células	SFB al 10% Dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich,W387520)

3.1.9. Marcadores y tinciones

Tabla 3.10. Descripción de marcadores y tinciones utilizados

Nombre	Referencia	Uso
Trypan Blue Solution, 0.4%	Gibco™ 15250061	Marcador de viabilidad celular
GelRed nucleic acid gel stain	Biotium41002	colorante de ácido nucléico
Imperial protein stain	PIER24617	Para la tinción de proteínas en geles de electroforesis de poliacrilamida.
Unstained SDS-PAGE Standards	BIO RAD 1610317	Marcador para geles de poliacrilamida
Precision Plus Protein Dual Color Standards	BIO RAD #1610374	Marcador para WB
1kb DNA ladder	New England Biolab N3232L	Marcador de peso molecular en geles de agarosa

3.1.10. Materiales varios

Tabla 3.11. Descripción de otros reactivos y materiales utilizados

Reactivos para ensayos de evaluación de la respuesta celular		
Nombre	Referencia	Uso
Merck™ Placas de filtro MultiScreen™ HTS de 96 pocillos con MCE	ThermoFisher Scientific 10689113	Placas para ensayos de ELISPOT
Leucosep™ Tubes	VWR 89048-934	Para la separación de linfocitos y células mononucleares periféricas
Materiales para ensayos de evaluación de la respuesta humoral		
Corning™ Placas para EIA/RIA Costar™ de 96 pocillos	ThermoFisher Scientific 10440862	Placas para ensayos de ELISA tapizando con péptidos
Reactivos relacionados con la transfección		
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	Invitrogen 11668-027	Para la transfección en células de insecto
Reactivos relacionados con el cultivo celular		
Trypsin-EDTA (0,25%), phenol red	GIBCO 25200072	Cultivo celular
Reactivos relacionados con el proceso de purificación de VLPs		
DNasa I recombinante; libre de RNasa	Roche 04 716 728 001	Tratamiento durante la purificación de las VLPs
Inhibidor de proteasas	Complete, Roche11836145001	
Sarkosyl (sodium N-lauroylsarcosine sodium salt)	Sigma L5125-50G	
Vertrel XF	Fluka, Sigma-Aldrich 94884	

3.2. Métodos

3.2.1. Mantenimiento de líneas celulares

Las líneas celulares de mamífero IBRS, BHK-21 y 293T se cultivaron en medio DMEM completo y suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB). Los cultivos se mantuvieron a 37°C, al 98% de humedad y 5% de CO₂. Las células se subcultivaron utilizando tripsina con EDTA.

La línea celular de insecto H5 se cultivó a 28°C en medio TNM-FH completo y suplementado con 5% de SFB y se subcultivó mediante disociación mecánica.

Los stocks de células se almacenan en nitrógeno líquido en 90% de SFB y 10% de DMSO a una densidad de 10⁶ células/ml en criotubos (Nunc).

3.2.2. Producción de VFA

Para la producción de VFA, la cepa O UK/01 se amplificó infectando monocapas de células IBRS confluentes y las cepas A22 Iraq y C S8c1 infectando células BHK, en un volumen reducido de medio DMEM completo sin suero, a una multiplicidad de 0.1 TCID₅₀/célula, durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se retiró el inóculo de virus, se añadió el medio DMEM completo y suplementado con 2% SFB y se continuó con la incubación a 37°C durante 16-24 h hasta conseguir un efecto citopático del 90% de las células. Se recogieron los sobrenadantes de la infección y se clarificaron mediante centrifugación a 450 x g durante 5 minutos a 4°C. Las muestras se conservaron en alícuotas a -70°C.

3.2.3. Titulación de VFA

La titulación de los preparados virales se realizó mediante ensayos de punto final o de formación de placas utilizando células IBRS o BHK-21 según la cepa. En el primer método de titulación se utilizan placas de 96 pocillos estériles de fondo plano (Nunc), en los cuales se añaden, en un volumen de 50 µl, diluciones seriadas en base 10 del virus, con al menos ocho réplicas de cada dilución. Posteriormente, se añaden en un volumen de 50 µl, 2.5X10⁵ células/pocillo. Las placas se incuban a 37°C durante 72 h. Finalmente, las células se fijan durante 20 minutos a temperatura ambiente con 10% formaldehído y se tiñen durante 1 hora adicional con 2% cristal violeta. Para cada dilución se determina el número de pocillos lisados completamente y se calcula el título, expresado en TCID₅₀/ml, mediante la fórmula de Reed-Muench [226].

Para el ensayo de formación de placas, las células se siembran a una concentración de 4x10⁵ células/ml en placas M6 en un volumen final de 2 ml/pocillo. Con una confluencia de 80% aproximadamente, las células son infectadas con diluciones seriadas en base 10 en un volumen final de 300 µl/pocillo. Tras retirar el inóculo, se añaden 2ml de medio semisólido para plaqueos. Tras 24-36h de incubación, las

células se fijan con formaldehído al 10% y las placas de lisis formadas se visualizan mediante tinción con cristal violeta. El título del virus se expresa como pfu/ml.

3.2.4. Extracción de RNA y síntesis de cDNA a partir de muestras celulares

Las muestras de células IBRS infectadas con VFA fueron preservadas en Trizol o TLR buffer de lisis para extraer el RNA mediante los kit de purificación Direct-Zol RNA Miniprep plus (ZymoResearch) o RNeasy® Mini (Qiagen), siguiendo el protocolo recomendado por cada fabricante. El RNA obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando un Nanodrop 2000.

Para la síntesis de cDNA y amplificación de la proteína VP1 de FMDV se utilizó el kit RT-PCR Onetaq Onestep (New England Biolabs) y los oligonucleótidos VP1-VFA ([Tabla 3.5](#)), siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de la amplificación de la VP1, los productos de PCR se analizaron mediante separación electroforética en geles de agarosa al 0.7% y tinción con GelRed®. Las bandas obtenidas se visualizaron usando ChemiDoc™ imaging System (Biorad). Las muestras se secuenciaron para buscar mutaciones de la secuencia codificante de la proteína VP1. La visualización de los datos de secuenciación se realizó mediante el programa SeqMan (DNASTAR Lasergene).

3.2.5. Transcripción *in vitro* de DNA

Para la síntesis *in vitro* de la molécula 5'pppRNA, descrita como agonista RIG-I, llamada M8, se realizó una transcripción *in vitro* del molde de DNA, utilizando el kit Megascript (Ambion) siguiendo indicaciones de la casa comercial. En resumen, se utilizaron oligonucleótidos complementarios específicos (100 µM) para alinear previamente el DNA, luego se realiza la reacción de transcripción utilizando 1 µg de DNA linearizado. Se realiza un tratamiento con 1 U/µl de Turbo DNasa (Ambion) y el producto resultante se purifica utilizando el kit de extracción miRNA (Qiagen). El RNA obtenido fue cuantificado con Nanodrop.

3.2.6. Cultivo de bacterias, transformación y purificación de ADNs plasmídicos

Se emplearon las cepas bacterianas *E. Coli* competentes NEB® 5-alpha (NEB) y HST08 (Clontech). Los cultivos se realizaron en medio líquido LB y en placas de LB agar en presencia de los antibióticos indicados siguiendo los procedimientos descritos en [\[227\]](#). Se usó el método de transformación química mediante choque térmico con bacterias competentes comerciales, siguiendo los protocolos del proveedor. Los ADNs plasmídicos se purificaron utilizando el kit ZR Plasmid Miniprep-classic (ZymoResearch) según las indicaciones del proveedor. La concentración y pureza de los ADNs purificados se verificaron mediante espectrofotometría utilizando un Nanodrop 2000.

3.2.7. Clonaje de los plásmidos para la generación de baculovirus recombinantes

Todos los plásmidos utilizados para la generación de los baculovirus recombinantes descritos en esta tesis se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida utilizando el kit comercial Q5® Site-Directed Mutagenesis (NEB), que permite la inserción, delección o modificación de secuencias de hasta 100 nucleótidos sobre plásmidos purificados, siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante. Como molde para las reacciones de mutagénesis, se partió inicialmente de los plásmidos pHAph306GS [89] ó pAH109 [20]. El plásmido pHAph306GS lleva inserto la secuencia codificante de la proteína VP60, VP2 y 3' UTRs de RHDV cepa AST/89 y el plásmido pAH109 lleva inserto una versión optimizada de la secuencia codificante de la proteína VP60 para su expresión en células de insecto.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada construcción utilizando la aplicación <http://nebasechanger.neb.com/>. Las secuencias codificantes de los epítomos de VFA a insertar en las posiciones seleccionadas de la proteína VP60 (tabla 3.6) fueron optimizadas para adaptar su uso de codones a células de insecto mediante la aplicación <http://www.jcat.de/>.

El primer paso del clonaje es una amplificación exponencial usando los oligonucleótidos diseñados (Tabla 3.5) y una mezcla que contiene la polimerasa de ADN de alta fidelidad Q5 Hot Start. El segundo paso implica la incubación en una única mezcla de enzimas que contiene una quinas, una ligasa y DpnI (KLD). En conjunto, estas enzimas permiten una rápida circularización del producto de PCR y la eliminación del plásmido original utilizado como molde. El último paso consiste en transformar células químicamente competentes de alta eficiencia (ver apartado 3.2.6). Se realizó una selección de colonias mediante reacciones de digestión con diferentes enzimas que nos permitiesen discriminar entre el molde y las construcciones positivas. Finalmente, se verificaron en cada caso la modificación de la secuencia original y la ausencia de mutaciones no deseadas en la zona codificante correspondiente a la proteína VP60 quimérica mediante secuenciación Sanger utilizando los oligonucleótidos BACF, BACR, 360F, 851F (Tabla 3.5). A continuación se indican los plásmidos generados, la estrategia utilizada y las principales características de las construcciones resultantes.

Tabla 3.12. Nomenclatura y contenido de los plásmidos generados.

Plásmido	Nombre de los oligonucleótidos	molde	Contenido del plásmido generado
pAH104	AH 104 F AH104 R	pHAph306GS	VP60: N-T O UK
pAH105	AH 105 F AH 105 R	pHAph306GS	VP60:L-B O UK
pAH106	AH 106 F AH 106 R	pAH104	VP60: N-B + T O UK
pAH107	AH 107 F AH 107 R	pAH105	VP60:L-B + T OUK

pAH108	AH 108 F AH 108 R	pAH105	VP60:L-B / N-T O UK
pGR2	GR 2 F GR 2 R	pAH108	VP60:L-B / N-T2 O UK
pGR11	GR 11 F GR 11 R	pAH109	VP60:L2-B O UK
pGR16	GR 16 F GR 16 R	pAH109	VP60:L-B A22 IRQ
pGR19	GR 19 F GR 19 R	pGR12	VP60:L-B O UK /L2-B A22 IRQ
pGR24	GR 24 F GR 24 R	pAH109	VP60:L-B C s8c1

3.2.8. Obtención de baculovirus recombinantes para la expresión de VLPs quiméricas

Los rBVs se obtuvieron por co-transfección del DNA plasmídico de cada una de las construcciones (Tabla 3.12) con el genoma baculoviral linearizado proporcionado en el kit flash BACULTRA (Oxford expression technologies) en células de insecto H5. La recombinación homóloga dentro de las células de insecto restablece el ORF 1629, permitiendo la replicación del virus recombinante e insertando los genes foráneos bajo el control del promotor polh en su genoma. En resumen, 4 µg de DNA plasmídico se co-transfectan junto con 20 ng de DNA viral del flash BACULTRA utilizando lipofectamina 2000, siguiendo el protocolo de la casa comercial. Por cada construcción se transfectan, en un volumen final de 500 µl de medio GRACES, un frasco T25 de células H5 al 70% de confluencia. De 4 a 6 horas post transfección, se retira el medio de transfección y se añaden 10 ml con medio TNM-FH completo. Tras 7 días de incubación a 28°C, se recogen las células junto al medio mediante acción mecánica con un raspador. Se centrifugan durante 5 minutos a 4°C y 700 x g para su clarificado. Este sobrenadante contiene el Pase 0 inicial (de bajo título) de cada virus recombinante, los cuales se almacenan en alícuotas a 4°C. Mediante infecciones consecutivas a baja multiplicidad en células H5 se obtiene un stock de virus de pase 2 (de alto título) que se utilizará como inóculo para la expresión de proteínas recombinantes.

3.2.9. Expresión de proteínas recombinantes y purificación de VLPs

Para la expresión de las proteínas recombinantes, se infectaron 6 frascos T150 con aproximadamente 1×10^7 células H5 cada uno a una alta multiplicidad con los baculovirus correspondientes. Tras incubar durante 4 días a 28°C, las células infectadas se recogieron mediante centrifugación a 700 x g durante 10 min a 4°C y se lavaron tres veces con PBS-V de la misma manera. Posteriormente, las células sedimentadas se lisaron mediante choque osmótico resuspendiendo en 5 ml de agua destilada con inhibidor de proteasas durante 10 min en hielo. Posteriormente, el lisado se trató con 5 µl de DNasa I recombinante (10 U/µl) durante 1 hora a temperatura ambiente intercalando 3-5 minutos de vortex ocasionalmente. A continuación, las muestras se ajustaron a 2% Sarkosyl (sodium N-lauroylsarcosine), 5 mM EDTA en PBS-V, y se incubaron durante 16 horas a 4°C. Posteriormente, los lisados celulares se

centrifugaron a baja velocidad a 18°C a 800 x g durante 10 minutos. Ultracentrifugar el sobrenadante de la centrifugación anterior en rotor SW28 a 131.453 x g, durante 2 horas y 30 minutos a 10°C. El material sedimentado se resuspendió en PBS-V, se sometió a 3 extracciones consecutivas con Vertrel XF, y se centrifugó nuevamente bajo las condiciones de centrifugación descritas. Nuevamente, el material sedimentado se resuspendió en PBS-V con inhibidor de proteasas y las preparaciones resultantes se mantuvieron a 4 °C. Todas las construcciones fueron analizadas por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie para determinar el grado de pureza de las proteínas recombinantes. La determinación de la concentración de proteínas se realizó utilizando el ensayo de cuantificación colorimétrica con BCA (Pierce), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, empleando concentraciones conocidas de BSA como patrón de referencia.

3.2.10. Microscopía electrónica

La concentración óptima para analizar por microscopía electrónica de transmisión (ME) los diferentes ensamblados de RHDV fue determinada empíricamente mediante la dilución seriada de los mismos en su tampón correspondiente. Sobre una gota de la muestra bajo estudio (2-5 µl) se depositó una rejilla de microscopía electrónica con carbón-colodión, previamente ionizada mediante descarga iónica, y se tiñeron con acetato de uranilo al 2% (p/v) durante 2min. Las micrografías se registraron con un microscopio electrónico Jeol 1200EXII estabilizado a 100 kV con un aumento nominal de 40,000x.

3.2.11. Obtención de adenovirus recombinantes

Para generar los adenovirus recombinantes se utilizó el sistema Adeno-X™ Adenoviral system 3 (Clontech). La secuencia codificante de la RNA polimerasa (3D) del VFA o su versión mutada 3D KAKA [220] se amplificaron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos Infusion 3D FMDV F y R (tabla 3.5) y el kit In-Fusion® HD Cloning Kit Clontech). Como molde para la reacción se utilizaron los plásmidos pGR4 y pGR5 (tabla 3.12), contruidos a partir del plásmido pET28a- 3D pol y pET28a- 3D KAKA (proporcionados por el Dr. E. Domingo).

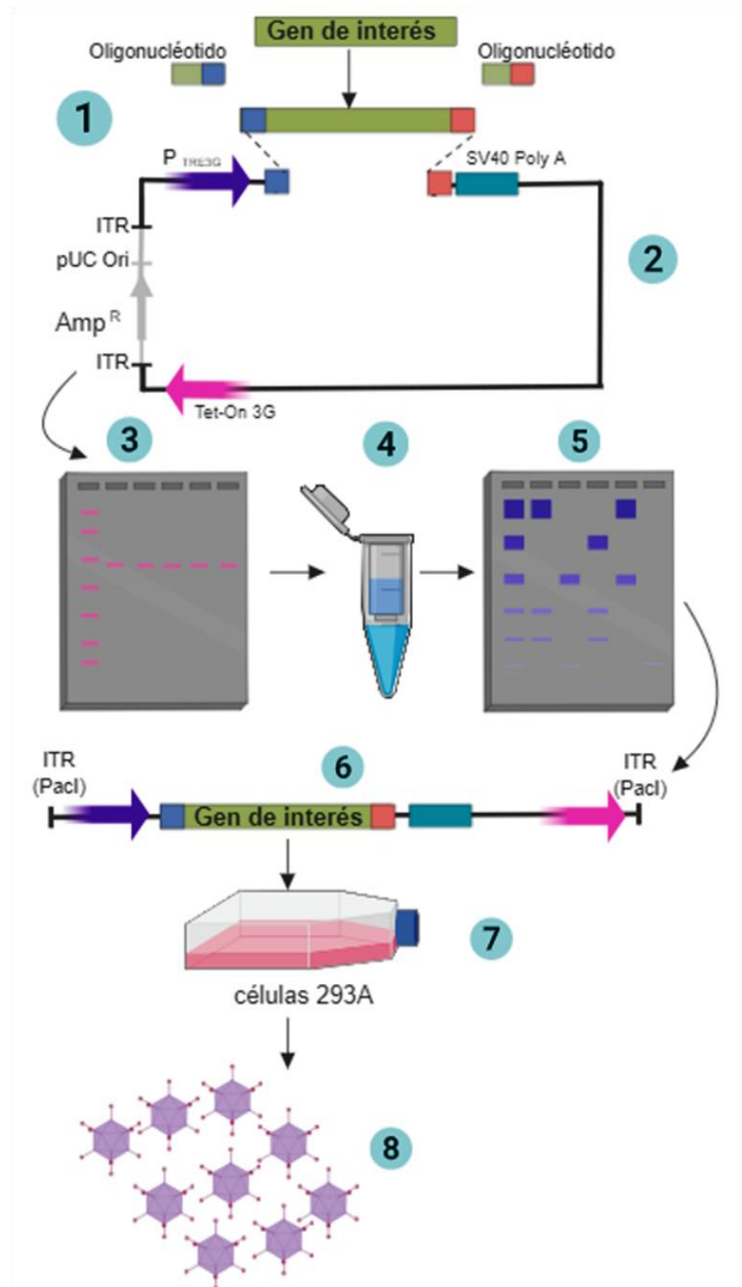


Figura 3.1. Obtención de adenovirus recombinantes mediante una estrategia de clonaje con tecnología In-Fusion. 1) El gen de interés se amplifica con extensiones de 15 pares de bases que son homólogas a los extremos del vector adenoviral linearizado. 2) El producto de la PCR se purifica luego y se mezcla con el vector adenoviral linearizado de elección en la reacción de fusión. Después de la reacción, una porción de la mezcla se transforma en *E. coli* (células competentes Stellar) y se tamiza. 3) Una vez que se identifica un clon PCR positivo, el vector pAdenoX recombinante se amplifica, 4) Se purifica y 5) Se digiere con XhoI y NheI para verificar la integridad. 6) Posteriormente se lineariza con la enzima de restricción PacI, 7) Luego se transfecta en células 293A para 8) La obtención y amplificación del adenovirus recombinante. Adaptado de AdenoX system 3, Clontech.

Mediante una reacción de recombinación, el producto de la PCR se clonó directamente en el plásmido adenoviral final. La integridad del plásmido purificado así como la presencia del inserto en la localización correcta se comprobó mediante digestiones con las enzimas Xho I y Nhe I. Se comprobó la ausencia de

mutaciones no deseadas en la secuencia codificante de las proteínas 3D y 3D KAKA mediante secuenciación Sanger con los oligonucleótidos 3D 378, F y R ([tabla 3.5](#)). Para la obtención de los adenovirus recombinantes correspondientes, se linearizaron 5 µg de los plásmidos con PacI y se transfectaron con CaCl₂ en células 293T siguiendo las instrucciones del proveedor. Tras 2 horas se substituyó el medio de transfección por medio fresco y a los 3 días de incubación las células se recogieron mediante centrifugación a 800 x g durante 10 minutos a 4°C. Para liberar el virus, las células se congelaron y descongelaron tres veces con 4 min de vortex en cada intervalo para obtener los pases 0. Los stocks virales se amplificaron en células 293T. Todos los stocks de adenovirus se titularon por triplicado mediante detección de formación de focos fluorescentes en células 293T.

3.2.12. Purificación de adenovirus recombinantes

La purificación de los stock de rAdV-3D y rAdV-3D-KAKA, junto con el adenovirus recombinante que expresa lacZ (rAdV-LacZ) obtenido en paralelo, se llevó a cabo siguiendo un protocolo modificado de [\[228\]](#). Brevemente, se infectaron células 293T a una multiplicidad de 5 en medio DMEM completo suplementado con 2% SFB. A los 3-4 dpi, tras alcanzar efecto citopático total, las células se recogieron mediante centrifugación durante 40 min a 1700 x g a 4°C y se resuspendieron en medio de cultivo en presencia de inhibidores de proteasas. Las células se congelaron (-70°C) y descongelaron (37°C) tres veces consecutivas, resuspendiendo con vórtex durante al menos 3 minutos en cada paso para liberar los virus al medio. Posteriormente, las muestras se clarificaron mediante centrifugación a 3000 x g a 4°C durante 30 minutos y los sobrenadantes se sometieron a una ultracentrifugación sobre un gradiente de densidad de CsCl en un rotor SW41Ti a 218.538 x g y 18°C durante 1:30 h. La banda correspondiente a las partículas virales se recogió en un volumen reducido y se sometió a un segundo gradiente de densidad de cloruro de cesio (CsCl) a 18°C durante 18 h. Se recogió la banda correspondiente a los virus y la muestra se microdializó utilizando filtros VSWP 0200 de 0.45 µ frente a tampón HEPES durante 2 h a 4°C. Los stocks virales se almacenaron en alícuotas a -70°C hasta su uso.

3.2.13. Análisis de proteínas por SDS-PAGE

3.2.13.1. Tinción con azul de Coomassie

Las muestras fueron hervidas durante 5 minutos en tampón de disociación de proteínas que contiene 5% (vol / vol) de β-mercaptoetanol, 2% (peso / vol) de dodecilsulfato de sodio (SDS), 10% (vol / vol) de glicerol, Tris-HCl 80 mM (pH 6,8) y azul de bromofenol al 0,01% (peso / volumen). Las proteínas se resolvieron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y se visualizaron mediante tinción con azul brillante de Coomassie siguiendo las instrucciones del producto comercial (Imperial protein stain, Thermo Fisher Scientific).

3.2.13.2. Transferencia de proteínas e inmunodetección en membranas (Western Blot)

Las muestras se sometieron a electroforesis en geles desnaturalizantes y posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF empleando el sistema de transferencia Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad). Una vez transferidas, las membranas se bloquearon con PBS suplementado con 5% (p/v) BSA durante 1 h en agitación. A continuación, las membranas se incubaron durante 16 h a 4°C con el anticuerpo primario a la dilución correspondiente en PBS + 1% BSA. Después de varios lavados con PBS-0.05% Tween-20, las membranas se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario a la dilución correspondiente. Seguidamente, tras varios lavados, las membranas se revelaron utilizando el reactivo Pierce™ ECL Plus Western Blotting (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las recomendaciones comerciales.

3.2.14. Experimentación animal

El diseño experimental y el mantenimiento de los animales se realizaron de acuerdo con las directrices nacionales y las establecidas por la Unión Europea sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Asimismo, los procedimientos de experimentación animal utilizados en esta tesis fueron autorizados por los Comités de Ética (CEEAA2013/009) y Bioseguridad del INIA (CBS 2013/006), con referencia PROEX 47/13.

3.2.14.1. Inmunización

- Ratones:
De manera general, en los experimentos *in vivo*, la inmunización con VLPs quiméricas se llevó a cabo en grupos de 5 a 10 ratones hembra de 6-7 semanas de edad de las cepas C57/BL6 o Swiss ICR-CD1. Los ratones fueron inmunizados por vía subcutánea (SC) con dos dosis de 100 µg de cada VLP en una emulsión preparada en un volumen final de 100 µl conteniendo en dicha formulación PBS-V y como adyuvante Montanide ISA 50V2 a una relación 1:1 v/v. Como controles se incluyeron grupos de ratones inmunizados con la VLP parental (sin epítomos foráneos) y otro al que se inoculó PBS-V. En ambos casos se añadió a la preparación adyuvante en las mismas condiciones. El protocolo de inmunización consiste en una inoculación inicial y un recuerdo (boost) con un intervalo de 20 días. Para la obtención de sueros, se tomaron muestras de sangre por punción de vena submandibular y se incubaron durante 1 hora a 37°C antes de ser centrifugadas durante 15 min a 250 x g a 4°C. Dichas muestras fueron tomadas al día 0, y en los días anterior y posterior al boost (dpb). En algunos casos parte, de los individuos de cada grupo fueron sacrificados D8pb para obtener el bazo y evaluar la respuesta celular.

Para las inmunizaciones con rAdV, se inocularon grupos de 10 ratones C57BL/6 por vía subcutánea con 100 µl de una preparación que contenía 1×10^9 IFU de los virus correspondientes.

- **Cerdos:**
Se inmunizaron grupos de 3 a 8 cerdas por vía intramuscular con dos dosis de 100 y 1000 µg de VLP dependiendo del experimento, en un volumen final de 2 ml, emulsionadas en Montanide ISA 50V2 a una relación 1:1 v/v. Se contemplaron grupos control a los cuales se les administró la VLP parental o PBS-V. El programa de vacunación consistió en dos dosis con un intervalo de 20 días. Se tomaron muestras de sangre por punción yugular con y sin EDTA al D0 del experimento y en los días anterior y posterior al boost.

3.2.14.2. Desafío viral con VFA

- **Ratones:** Para los desafíos, los ratones fueron trasladados a las instalaciones de nivel de contención biológica NCB3+ del CISA en áreas designadas para la manipulación de VFA. Se infectaron por vía intraperitoneal (IP) con 1×10^3 TCID₅₀ por animal de VFA serotipo C cepa Cs8 clon 1.
- **Cerdos:** Para los desafíos, los cerdos fueron trasladados a las instalaciones de nivel de contención biológica NCB3+ del CISA y se inoculaban intradérmicamente en el rodete coronario con 1×10^3 TCID₅₀ en 200 µl de VFA serotipo O UK/01. Durante 10 días se revisaron los animales diariamente, registrando temperatura y aparición de signos clínicos característicos de la enfermedad. La clínica observada se cuantificó por un sistema de puntaje (tabla 3.13). La protección total se definió como la ausencia completa de síntomas y lesiones fuera del punto de inoculación. Se consideró protección parcial cuando se desarrollaron lesiones características de la enfermedad más tarde (3 o más días) que en los controles de infección (cerdos no inmunizados) y su distribución no fue generalizada (lesiones en las cuatro extremidades y rostro). Se tomaron muestras de sangre e hisopos nasales y faríngeos a intervalos de 2 días de todos los animales durante 10 días hasta el sacrificio.

Tabla 3.13. Sistema de puntaje establecido para evaluar la clínica post desafío en cerdos

Signo clínico	Puntuación
Temperatura de 40°C	1
Temperatura de 40.5°C	2
Temperatura de 41°C	3
Reducción de apetito	1
No ingestión	2
cojera	1
No apoya la extremidad	2
Calor y dolor a la palpación	1
Postración	2
Lesiones en las extremidades	Máximo 4 (Sin contar el punto de inoculación)
Lesión en boca	1
Lesión en labios	1
Lesión en morro	1
Total	16 puntos

Descrito en Cubillos et al 2012 [209]

3.2.15. Obtención de células primarias para ensayos funcionales

- **Esplenocitos murinos:**

Para la obtención de esplenocitos murinos, se recogieron los bazo de los animales a estudiar en medio RPMI 1640 completo. El órgano se disgregó a través de medios mecánicos y las células se filtraron empleando un filtro de nylon de 70µm. Todas las muestras se llevaron a un volumen de 10 ml con PBS con EDTA y se centrifugaron a 450 x g durante 5 minutos a 4°C. Los eritrocitos se eliminaron mediante incubación durante 5 minutos con solución de lisis. Tras 3 lavados en PBS con EDTA, los esplenocitos se resuspendieron en 5 ml de medio RPMI completo + 5% de SFB linfos. Las células se mantuvieron a 4°C durante 16 horas.

- **CMSP de cerdo:**

Se extrajeron 8 ml de sangre por animal obtenida mediante punción de vena cava craneal, recogándose en tubos estériles con EDTA como anticoagulante a una concentración final de 8 mM. A tubos Leucosep de 12 ml se añadieron 3 ml de medio Histopaque 1077 y se centrifugaron durante 30 segundos a 1000 x g para luego añadir los 8 ml de sangre con EDTA. Los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 1000 x g, a TA y se recogió la banda correspondiente a los CMSP de cada muestra en un tubo limpio. La muestra se completó con PBS-EDTA hasta llegar a 10 ml y se centrifugó durante 10 minutos a 250 x g a 4°C. En aquellas muestras en las que se observó presencia de eritrocitos, se llevó a cabo un tratamiento hipotónico con H₂O durante 30 segundos. Tras 2 lavados con PBS-EDTA los CMSP se mantuvieron en medio RPMI completo más 5% SFB a 4°C ON. El recuento celular se realizó en cámara de Neubauer, utilizando azul de trypan 0.4% en PBS como colorante para calcular la viabilidad de las células.

3.2.16. Ensayos para la caracterización de la respuesta inmune

3.2.16.1. Ensayos para la evaluación de la respuesta humoral

La respuesta humoral fue evaluada usando muestras de suero obtenidas tal como se describe en el [apartado 3.2.14.1](#).

- **Determinación de títulos de Acs de animales inmunizados por ELISA**

- **IgG totales frente al péptido B VFA:**

Para determinar Acs específicos frente a los epítomos heterólogos presentados por las VLPs quiméricas, se tapizaron placas de 96 pocillos EIA/RIA High Bind con 10 ng/pocillo de péptidos sintéticos B (SN1) diluidos en tampón carbonato/bicarbonato mediante incubación durante 18 horas a 4°C. Las placas se bloquearon con PBS-T más 5% (p/v) de leche desnatada durante 1 hora a 37°C en agitación. A continuación se añadieron diluciones seriadas (factor de dilución 3) de los sueros en PBS-T+3% leche, que se incubaron durante 1 hora a 37°C en agitación. En cada placa se incluyeron

muestras de suero control positivo y negativo, también en diluciones seriadas. Tras 3 lavados con PBS-T, las placas se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra específico para IgG de ratón marcado con HRP en dilución 1:3000 en PBS-T con 3% de leche, durante 45 minutos a 37°C en agitación. En el caso de muestras de suero porcino, se utilizó como secundario Proteína A conjugada con HRP (Pierce) a una dilución 1/4500. Finalmente, las placas se lavaron 3 veces con PBS-T y se revelaron con el sustrato Tetramethyl Benzidine (TMB). La reacción se detuvo añadiendo 1.8N H₂SO₄ trascurridos 15 minutos en oscuridad y a continuación se determinó la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450nm.

○ **Inmunoglobulinas Isotipos frente al péptido B de VFA:**

Para determinar la subclase de isotipos se siguió el protocolo descrito en el párrafo anterior con la excepción de que se utilizaron como conjugados Acs frente a IgG1, IgG2a, IgG2b e IgA murinos a una dilución 1/2000 o, en el caso de ensayos con suero de cerdo, Acs frente a IgG1, IgG2 e IgA porcinos a una dilución 1/1000.

○ **IgG frente a VFA:**

Para determinar los Acs específicos frente a FMDV, se tapizaron placas de 96 pocillos maxisorp (Nunc) con una dilución en PBS de VFA del serotipo O, cepa O-UKG 11/01 purificado en gradiente de sacarosa (~0.1µg/pocillo) y se incubaron a 4°C durante 18h. El protocolo de los ensayos fue similar al descrito en el primer párrafo, utilizando como anticuerpo secundario la Proteína A-HRP y como sustrato TMB.

○ **IgG frente a VP60:**

Se tapizaron placas Polysorp (Nunc) con 300 ng/pocillo de VLP de RHDV en tampón carbonato/bicarbonato. El protocolo de los ensayos fue similar al descrito en el primer párrafo, con la excepción de que se utilizaron como Acs primarios los sueros de animales inmunizados en diluciones seriadas (factor de dilución 3) y como secundario Proteína A-HRP de Pierce a una dilución 1/4000. La señal se reveló con el sustrato de la peroxidasa OPD. Transcurridos 30 minutos en oscuridad, la reacción se detuvo añadiendo 3N H₂SO₄ y a continuación se determinó la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 492nm.

Los títulos de Acs frente a cada antígeno se definieron como el inverso de la dilución más alta, calculada por interpolación, a la cual la absorbancia registrada es igual al promedio de la absorbancia de las muestras del tiempo 0 más dos veces la desviación estándar.

● **Ensayo de seroneutralización del VFA**

La determinación de los títulos de AcsN en suero se realizó siguiendo el protocolo estandarizado de ensayo de microneutralización en placas de 96 pocillos (Manual OIE). Para ello se preparan diluciones

seriadas en base dos de los sueros que se incubaron durante 1 hora a 37°C con 100 TCID₅₀ de la cepa del VFA correspondiente. La actividad viral presente en dichas mezclas se determinó tras la adición de células IBRS o BHK-21 y la incubación de las placas durante 3 días tras los cuales se fijaron y tiñeron como se describe en el [apartado 3.2.3](#). Los títulos se calcularon como el recíproco de la dilución final de suero capaz de neutralizar 100 TCID₅₀ de virus en el 50% de los pocillos. Como controles se añadieron en cada placa pocillos con muestras positiva (suero neutralizante), negativa (suero no neutralizante), control de células sin infectar y control de infección con diluciones en base 10 de la dilución de VFA usada para el resto de la placa.

3.2.16.2. Ensayos para evaluar la respuesta celular

- **ELISPOT IFN γ**

Se tapizaron placas de 96 pocillos MultiScreen-HA Filter con un anticuerpo monoclonal anti IFN γ murino o porcino (dependiendo de las muestras) a una concentración de 5 μ g/ml en PBS, pH 7.2 a 4°C durante 18h. Las placas se bloquearon con RPMI 1640 completo con 10% SFB inactivado. Se utilizaron 2.5-5 X10⁵ células por triplicado que se estimularon con 100 μ g/ml de péptidos T específicos de VFA y con 40 μ g/ml de VP60. Como control positivo se estimularon células con PHA-L (80 μ g/ml) y como control negativo se dejaron sin estímulo (sólo medio). Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% CO₂ durante 48-72 horas. Posteriormente los spots se revelaron utilizando el Mab anti-IFN γ -Biotina murino o porcino a una concentración de 2 μ g/ml en PBS-S, seguido de Streptavidina-HRPO y el substrato AEC siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se detuvo añadiendo H₂O desionizada y los spots se contaron en un lector automático (AID Spot Readear ELR08). Los resultados obtenidos se expresan como el número de puntos coloreados por x10⁶ cel. (valor medio de triplicados), restando los valores de fondo (número de puntos obtenidos en los pocillos con células no estimuladas con el péptido sintético).

- **Linfoproliferación con [³H]-Timidina:**

Los ensayos de linfoproliferación se realizaron en placas estériles de 96 pocillos con fondo en U, utilizando una concentración de 3·10⁵ células/pocillo. Las CMSP o esplenocitos se estimularon con las mismas condiciones descritas en el ensayo de ELISPOT-IFN γ . Como control positivo se utilizó concanavalina-A (Con-A) (2.5 μ g/pocillo) y como control negativo se emplearon CMSP o esplenocitos incubados solo con medio. Todas las incubaciones se realizaron a 37°C en atmosfera 5% de CO₂, por triplicado y en un volumen final de 200 μ L, durante 72 hrs y se marcaron durante 18 horas con 0.1 μ Ci/100 μ L de [³H]-Timidina (Perkin Elmer, Life Science). La incorporación del marcador radioactivo a las células se midió empleando un contador de centelleo (Microbeta Counter Becton Dickinson). Se calcula el valor medio de los triplicados realizados y los resultados se expresan como índices de estimulación (IE) (cpm cultivos estimulados / cpm del control sin antígeno).

3.2.17. Selección y caracterización de mutantes de escape de VFA

Siguiendo el protocolo del ensayo de reducción de placas ya descrito, se realizaron experimentos similares en los que sueros con AcsN fueron diluidos hasta encontrar la dilución de mayor concentración de suero que permitía la replicación del virus. Como control se lleva a cabo el mismo experimento utilizando sueros no neutralizantes. El SN en los pocillos que cumplían estas condiciones, fueron recogidos y una parte de ellos fue preservado en trizol. Se realizó la extracción de RNA mediante el kit Direct-Zol RNA Miniprep plus (Zymoresearch) siguiendo el protocolo de la casa comercial. Seguidamente se continuó con la síntesis de cDNA y amplificación de la proteína VP1 de VFA con el kit RT-PCR Onetaq Onestep (NEB) y oligonucleótidos VP1-VFA (descritos en materiales y métodos), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR se analizaron mediante separación electroforética en geles de agarosa (Conda) al 0.7% y GelRed® (Biotium). En paralelo se cargó marcador 1kb DNA Ladder (Invitrogen). Como tampón de electroforesis se utilizó TAE 1X a una corriente continua de 90 voltios durante 45 min y se observó en ChemiDoc™ imaging System (Biorad) para comprobar la expresión de la banda con el peso molecular correspondiente. Las muestras positivas se llevaron a secuenciar para buscar mutaciones de la secuencia codificante. La visualización de los datos de secuenciación se realizó mediante el programa SeqMan (DNASTAR Lasergene).

3.2.18. Análisis estadístico

El procesamiento estadístico de los datos se llevó a cabo usando el programa GraphPad Prism 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Los títulos de Acs se reportaron determinando el título geométrico medio (TGM) con el 95% del intervalo de confianza (CI) de cada grupo de animales analizado. Las comparaciones entre los diferentes grupos se realizaron aplicando un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), en combinación con la prueba post-hoc para el tratamiento de datos de Tukey o de Dunnett. En los casos en las que se comparan dos grupos se realizó una prueba no pareada t de student con un CI del 95% y cuando se comparan los títulos de Acs del mismo grupo en dos tiempos distintos, se realizó una prueba pareada de t de student con CI del 95%. Los valores p mostrados corresponden a comparaciones bilaterales, considerándose significativo $P \leq 0.05$. En las figuras, el valor p está representado como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

Capítulo 4

Resultados



4.1. Inducción de respuestas inmunes específicas frente al VFA en modelo murino utilizado VLPs quiméricas de RHDV presentadoras de epítomos B y T del VFA

4.1.1. Generación y caracterización de VLPs quiméricas RHDV-VFA

Se generaron baculovirus recombinantes que expresan diferentes mutantes de inserción de la proteína VP60 (Figura 4.1). Las secuencias heterólogas insertadas son epítomos B y T bien caracterizados del cepa UKG/35/2001 del serotipo O del VFA (ver [Tabla 3.6](#) del capítulo materiales y métodos). La secuencia heteróloga PVTNVRGDLQVLAQKAART (19aa), contiene el denominado sitio neutralizante 1 (SN1) de la proteína estructural VP1, localizado entre las posiciones aminoacídicas 140-158. La secuencia heteróloga AAIEFFEGMVHDSIK (15aa), corresponde al epítomo T identificado entre las posiciones 21-35 de la proteína no estructural 3A. Ambas secuencias se insertaron en la proteína VP60 de RHDV flanqueadas por los aminoácidos GS, con el fin de facilitar la colocación del péptido insertado en la estructura de la cápsida viral.

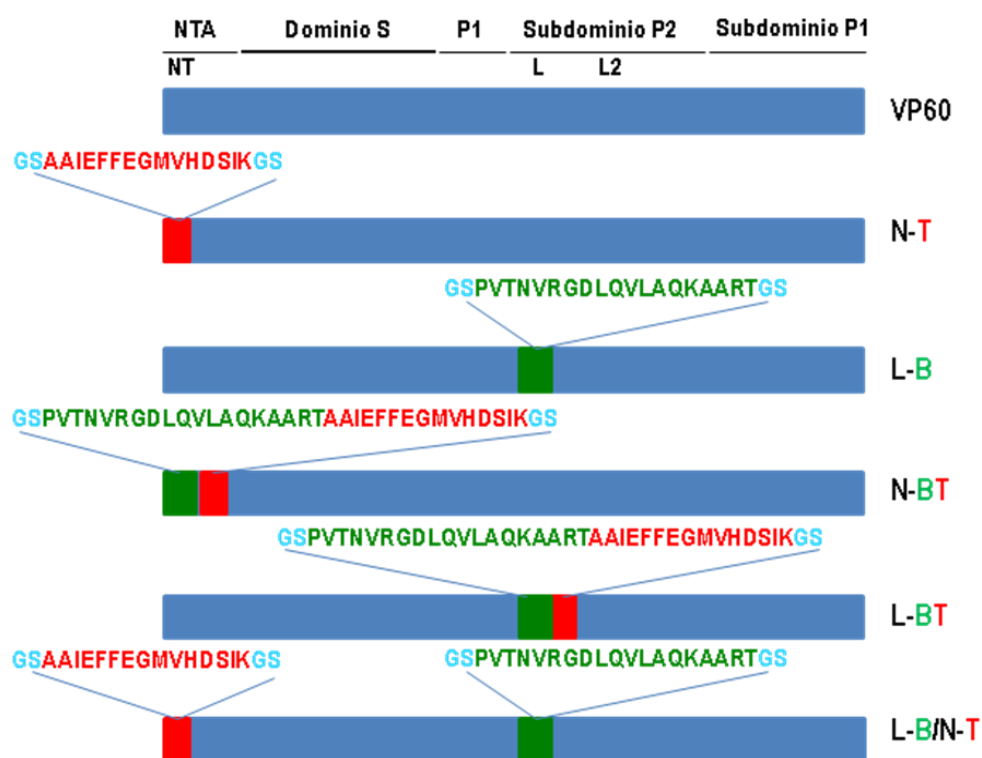


Figura 4.1. Representación esquemática de los mutantes de inserción de la proteína VP60 que incorporan epítomos B y T del VFA. A la derecha se muestra el nombre de cada construcción. La barra horizontal de color celeste representa la proteína VP60 de RHDV y sobre ella los sitios de inserción de secuencias heterólogas: NT, L y L2. Las barras verdes y rojas representan los péptidos B y T respectivamente. Se indican los dominios estructurales principales de la proteína VP60.

Las secuencias heterólogas de epítomos B y T se insertaron en dos localizaciones distintas de la proteína VP60, en tándem o por separado en cada sitio. Se generaron mutantes de inserción que incorporaban el epítomo T o el BT en el extremo N-terminal (entre las posiciones 2 y 3) de la proteína VP60 (N-T, N-BT, L-

B/N-T). De acuerdo con el modelo atómico de la proteína VP60 [83, 85], el extremo N-terminal se localiza hacia la cara interna en la cápsida viral. Otro grupo de mutantes de inserción incorpora el epítipo B o el BT entre las posiciones 306-307 de la proteína VP60 (L-B, L-BT, L-B/N-T). Este sitio de inserción se localiza en el bucle L, en la región apical del subdominio P2 de la proteína VP60, una zona muy expuesta en la superficie de la cápsida de RHDV [85]

La expresión de todas las proteínas recombinantes generadas se evaluó mediante SDS-PAGE a partir de extractos de células H5 infectadas con los baculovirus recombinantes correspondientes. Los niveles de expresión de los mutantes de inserción fueron similares a los de la proteína VP60 parental y las bandas correspondientes exhibieron movilidades electroforéticas de acuerdo al tamaño esperado en cada caso (aprox. 60 kDa). Las proteínas recombinantes se purificaron siguiendo el protocolo de obtención de VLPs de RHDV establecido previamente en nuestro grupo (Figura 4.2).

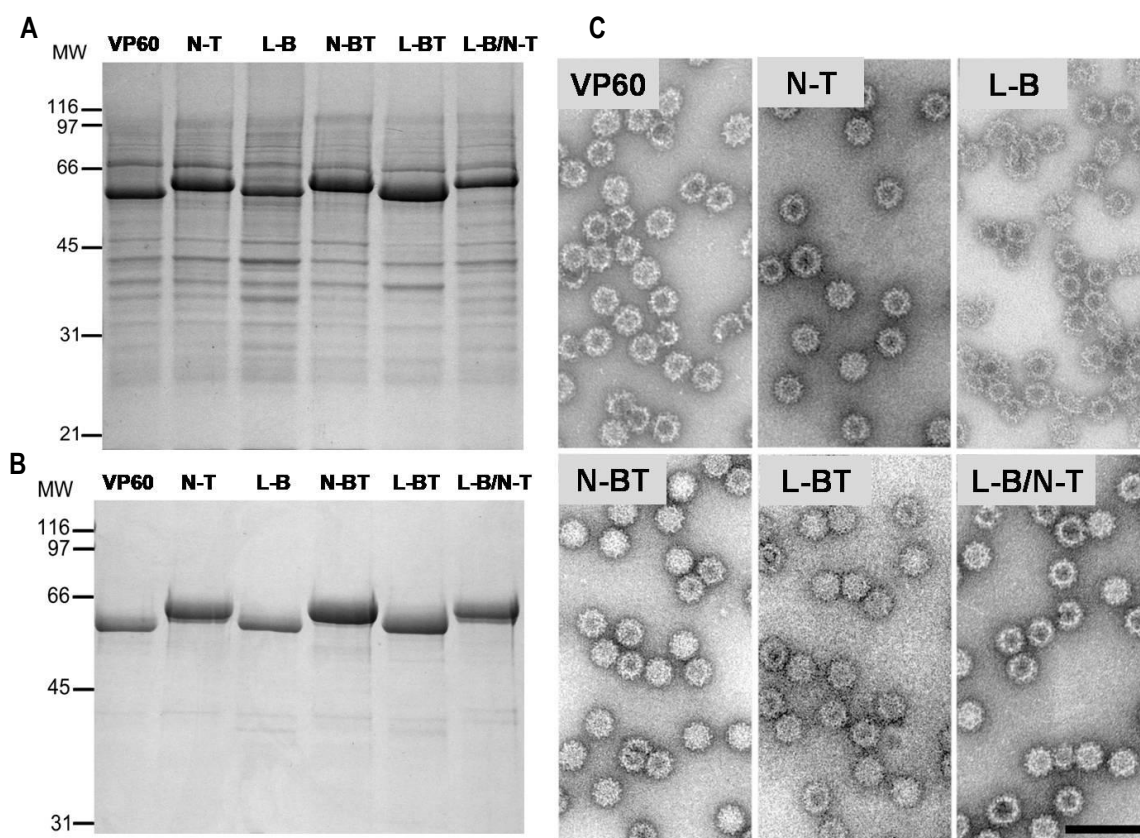


Figura 4.2. Análisis de los mutantes de inserción de la proteína VP60. Se analizaron los mutantes en geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. (A) Extractos de células H5 infectadas con los baculovirus recombinantes generados. (B) Análisis de los mutantes de inserción de la proteína VP60 purificados. (C) Análisis por tinción negativa de preparaciones purificadas de las VLPs indicadas. Abajo a la derecha se indica la barra de tamaño que representa 100 nm.

A continuación, para determinar si las nuevas construcciones quiméricas conservaban la capacidad de autoensamblaje de la proteína VP60 en forma de material particulado, las proteínas purificadas se analizaron por microscopía electrónica mediante tinción negativa (Figura 4.2). Dicho análisis reveló que

todas las proteínas quiméricas generadas eran capaces de formar VLPs con un diámetro aproximado de 40 nm, morfológicamente similares a las VLPs formadas por la proteína nativa VP60.

4.1.2. Inmunogenicidad en ratón de VLPs quiméricas RHDV-VFA

La respuesta inmune humoral y celular inducida por las VLPs quiméricas, que denominamos colectivamente RHDV-VFA, se evaluó en primer lugar en el modelo murino. Para ello, se inmunizaron grupos de 5 ratones de la cepa Swiss ICR (CD-1) por vía subcutánea (SC) dos veces (con un intervalo de 22 días), con 100 µg de VLPs emulsionadas con Montanide 50V2 (Figura 4.3). Se incluyeron en este estudio las VLPs quiméricas: N-T, L-B, N-BT, L-BT. Como controles se incluyeron grupos de ratones inmunizados con VLPs de RHDV (grupo VP60) y un grupo control negativo inoculado con PBS-V. Adicionalmente, se incluyó un grupo en el que la construcción L-B/N-T se inoculó sin adyuvante. Los días 22 y 40 (18 días post-boost) se tomaron muestras de suero de todos los animales.

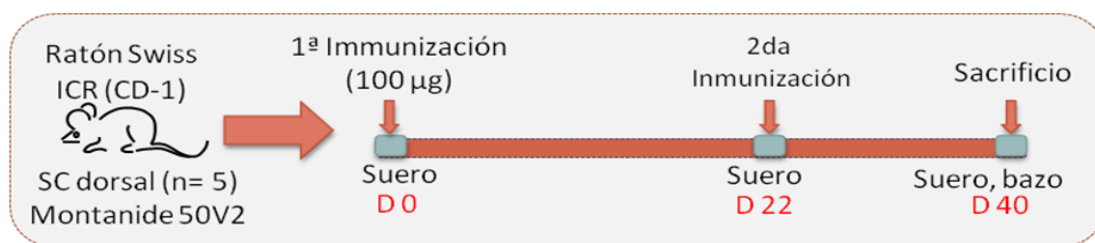
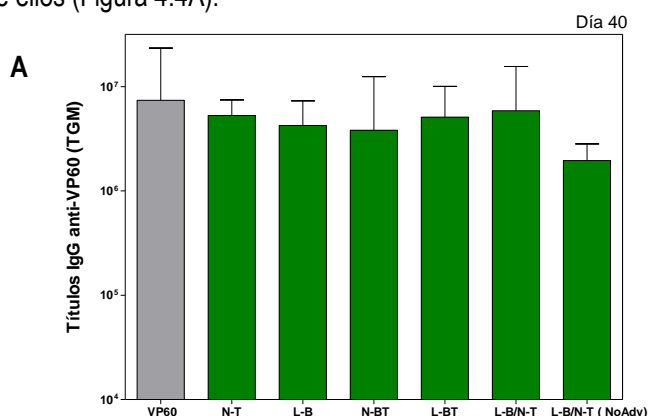


Figura 4.3. Esquema de la inmunización de ratones con las VLPs quiméricas RHDV-VFA.

4.1.2.1. Respuesta humoral inducida por las VLPs quiméricas RHDV- VFA

Los sueros obtenidos se analizaron por ELISA para detectar Acs (IgGs) frente a la proteína VP60 (empleando VLPs de RHDV como antígeno) y frente al epítipo B del VFA (empleando un péptido sintético con la secuencia del epítipo B). Se determinó el título medio geométrico (TGM) de cada grupo de ratones analizado. Todos los sueros pre-inmunes resultaron negativos para IgGs frente a los dos antígenos, así como todos los sueros de los ratones del grupo control negativo (PBS-V) (datos no mostrados). Todos los ratones inmunizados con VLPs derivadas de RHDV, tanto la VLP parental como las quiméricas, desarrollaron títulos altos y similares de Acs anti-VP60, no encontrando diferencias significativas entre ellos (Figura 4.4A).



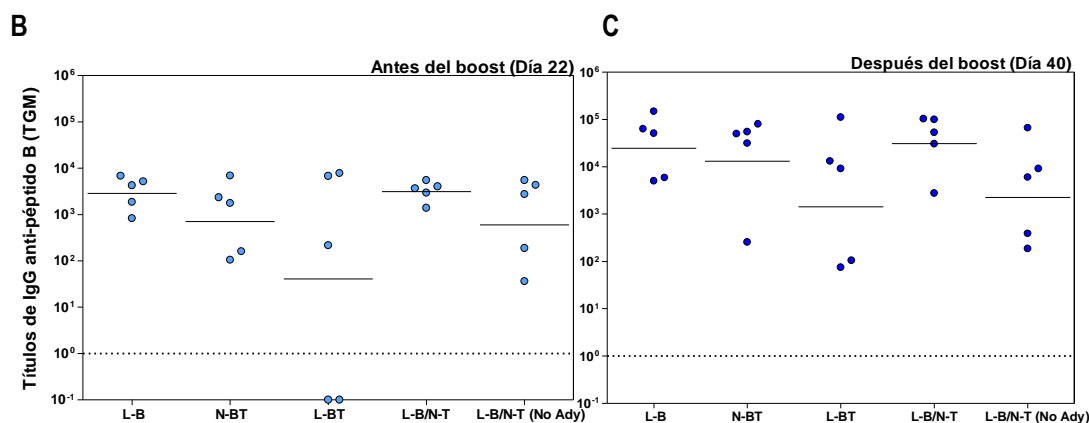


Figura 4.4. Respuesta humoral inducida por las VLPs quiméricas RHDV-VFA en ratón. Los sueros de los grupos de ratones inmunizados se analizaron por ELISA para determinar los títulos de Acs IgGs frente a la proteína VP60 (A) y al epítipo B de VFA, antes (B) y después del boost (C). En (A) las barras representan los títulos medios geométricos (TGMs) de los sueros tomados al día 40 post inmunización de cada grupo de ratones y las barras de error indican la desviación estándar. En (B y C) los puntos indican el título obtenido por animal y la barra horizontal la media de cada grupo.

Todos los ratones inmunizados con VLPs quiméricas que incorporan el epítipo B del VFA, desarrollaron títulos elevados de Acs específicos frente al mismo (Figura 4.4 B y C). Como era de esperar, los sueros de los ratones inmunizados con la construcción parental VP60 y que no incorporan el epítipo B del VFA resultaron negativos en este caso (datos no mostrados). La dispersión de la respuesta humoral anti-peptido B difirió significativamente entre los grupos de ratones en los títulos obtenidos antes del boost (Figura 4.5 B), incluso 2 de los 5 ratones inmunizados con la construcción L-BT, fueron negativos. Sin embargo, la media de los títulos alcanzados antes y después del boost es equiparable entre grupos. Por otro lado, los resultados muestran diferencias en función del sitio de inserción y la presentación de los epítipos en conjunto o separado. La incorporación del epítipo B de VFA en cualquiera de las dos posiciones evaluadas, permite que las VLPs quiméricas induzcan Acs específicos. Sin embargo, las construcciones que incorporan únicamente el epítipo B en el loop 1 (L-B y L-B/N-T), inducen títulos de Acs anti-peptido B más elevados con una sola dosis, así como una menor dispersión de los títulos de Acs entre los sueros de los ratones del grupo, que las construcciones que incorporan el epítipo B junto con el epítipo T (N-BT y L-BT).

Por otro lado, puesto que una de las propiedades *per se* de las VLPs es su elevada inmunogenicidad, exploramos la posibilidad de que actuaran como adyuvante en nuestra estrategia vacunal. Para ello inmunizamos un grupo de ratones con la construcción L-B/N-T sin Montanide. Los resultados muestran que también fue eficiente para la inducción de Acs específicos al péptido B y, aunque las diferencias no fueron significativas con respecto a su homólogo con Montanide, los títulos de este grupo se mostraron más bajos (Figura 4.4 B y C).

En los grupos que mostraron títulos más elevados de Acs frente al péptido B (L-B, N-BT y L-B/N-T), se analizó también la distribución de las subclases de isotipos (IgG1, IgG2a e IgG2b) (Figura 4.5). Los

resultados muestran que en todos los grupos evaluados, la subclase IgG1 es mayor en comparación con la de IgG2a e IgG2b, sin diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la distribución de isotipos.

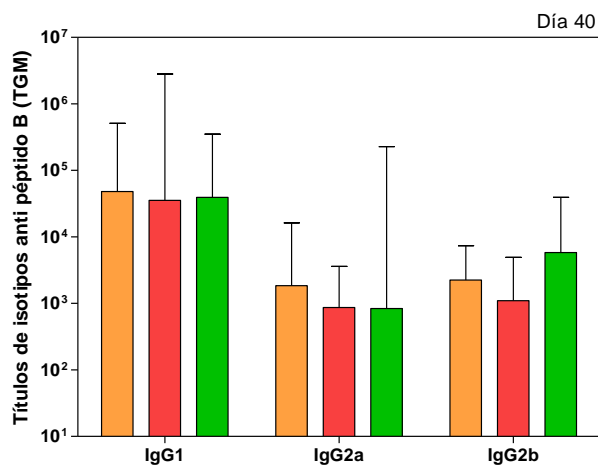


Figura 4.5. Títulos de isotipos de Acs específicos. Los sueros post-boost (D40 post inmunización) de los grupos de ratones indicados se analizaron por ELISA para determinar los títulos de isotipos de los Acs IgGs frente al epítipo B de VFA. Se representan las TGMs con un CI del 95% de cada grupo de ratones identificados por colores: L-B (naranja), N-BT (rojo), L-B/N-T (verde).

Se analizó la presencia y magnitud de la actividad neutralizante frente a la infección de células IBRS por el VFA, en los sueros de los ratones inmunizados con las distintas VLPs químicas. Para ello se realizó el ensayo de seroneutralización en presencia de sueros de ratones inmunizados, siguiendo los procedimientos descritos en Materiales y Métodos. Los sueros del grupo control negativo (PBS-V) no mostraron actividad neutralizante, al igual que los correspondientes a los grupos inmunizados con VP60 y N-T (que solo lleva inserto el epítipo T) (datos no mostrados). Todos los sueros de ratones inmunizados con VLPs químicas incorporando el epítipo B mostraron actividad neutralizante frente a VFA, aunque con niveles diversos (títulos variables por ratón/grupo). La respuesta más elevada y homogénea fue conseguida con en el grupo inmunizado con L-B/N-T (Figura 4.6).

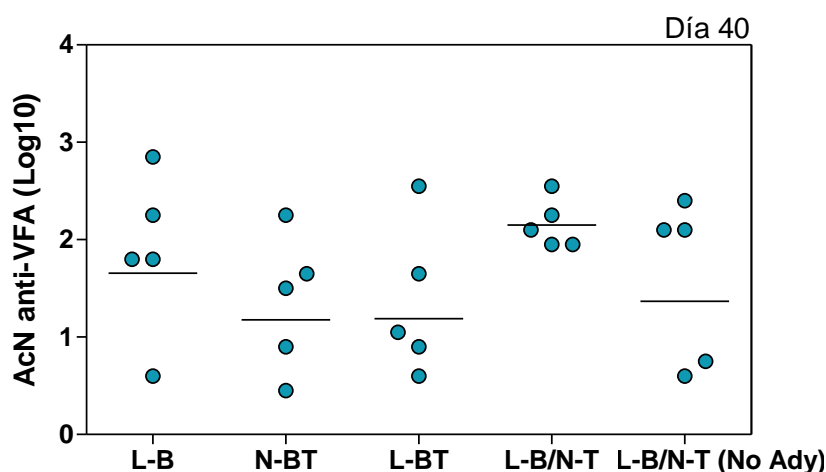


Figura 4.6. Actividad neutralizante frente al VFA inducida por las VLPs RHDV-VFA. El título de AcN determinado para cada animal se expresó como el logaritmo en base 10 (\log_{10}) del valor recíproco de la mayor dilución ensayada capaz de neutralizar 100TCID₅₀ del virus homólogo. La línea horizontal representa la media geométrica del grupo.

4.1.2.2. Respuesta celular inducida por las VLPs quiméricas RHDV- VFA

Para detectar células secretoras de IFN γ específicas a VFA inducido por las VLPs quiméricas se realizó un ensayo de ELISPOT como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos muestran una respuesta de gran magnitud de IFN γ específica al estímulo de la proteína VP60, fue significativamente mayor en todos los grupos inmunizados con las VLPs quiméricas (Figura 4.7 A). Por otro lado, también se generó una respuesta celular específica frente al VFA en células de animales inmunizados con VLPs que llevan los epítomos B y T heterólogos (Figura 4.7 B). Además se detectaron células secretoras de IFN γ específicas al estímulo del péptido T insertado en las VLPs, encontrando diferencias significativas entre los grupos que L-BT y L-B/N-T en comparación con el grupo PBS (Figura 4.7 C).

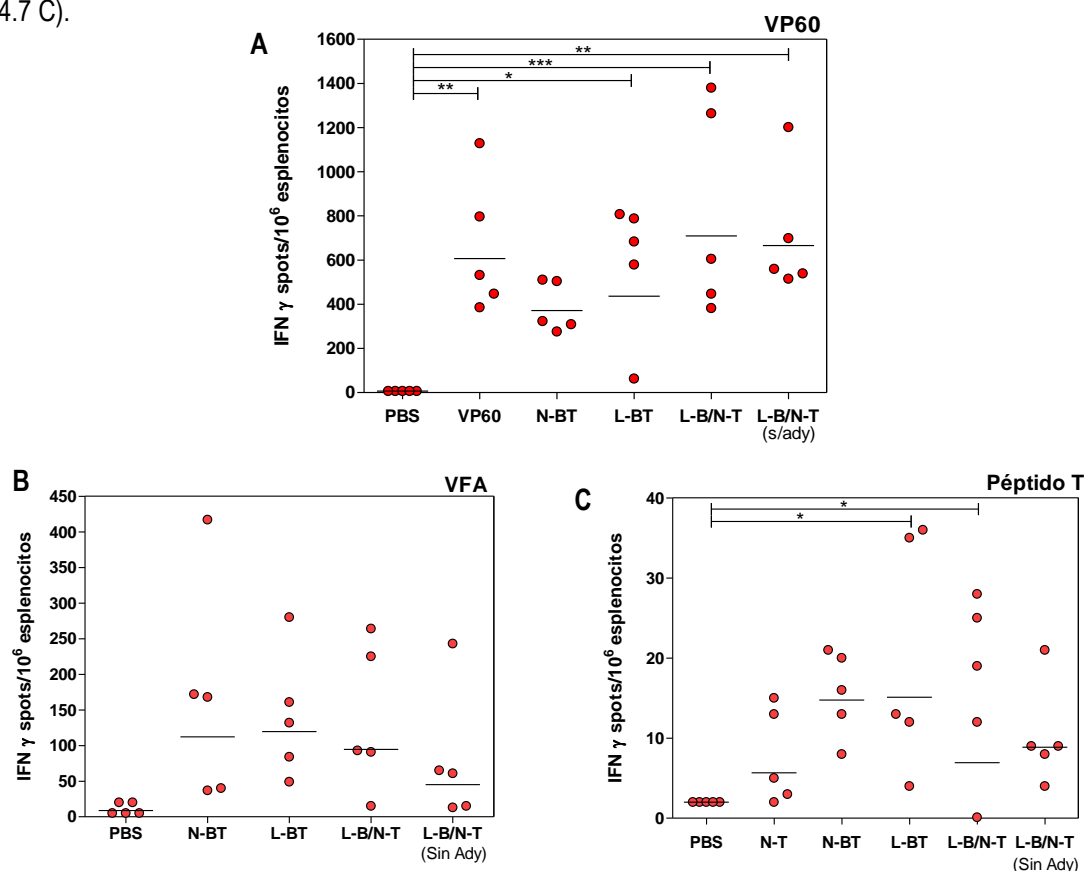


Figura 4.7. Ensayo ELISPOT IFN γ . Número de células secretoras de IFN γ específicas detectadas al estimular con VP60 (A), VFA (B) y epítomo T (C) en animales inmunizados con las VLPs RHDV-VFA indicadas. Las gráficas expresan el número de células detectadas/millón de esplenocitos. Los círculos rojos muestran la señal media dada por individuo analizado por triplicado. La barra horizontal muestra la media de cada grupo.

Los principales resultados de estos experimentos nos indican que el epítomo B en el contexto de la presentación mediante VLPs, es capaz de inducir una respuesta humoral potente en el modelo murino, incluyendo la producción de títulos elevados de AcsN. La VLP L-B/N-T fue la construcción quimérica que indujo títulos de AcsN más elevados y homogéneos. Las construcciones que llevan el epítomo T, a pesar de inducir una respuesta celular específica frente al mismo, ésta no fue muy elevada.

4.2. Inmunogenicidad y protección inducida en cerdo por la VLP quimérica RHDV-VFA frente al desafío viral

De las VLPs quiméricas valoradas en ratón, seleccionamos para su evaluación en cerdo (hospedador natural del VFA), la construcción L-B/N-T. Esta VLP presenta los epítopos B y T insertados por separado en dos localizaciones de la secuencia de VP60: bucle L y extremo N-terminal, respectivamente. Para este estudio, se inmunizaron por vía intramuscular (IM) 6 cerdos domésticos Landrance x Large White, separados en dos grupos de 3 animales, con 100 y 1000 µg de VLP, emulsionadas con Montanide 50V2 (Figura 4.8). Los animales recibieron dos dosis de inmunógeno, administradas el día 0 y 19. Se incluyó además, un grupo control compuesto por 2 cerdos, a los cuales se les administró PBS. A los 30 días después el boost, los animales se inocularon por vía intradérmica en el rodete coronario, con 10^3 TCID₅₀ de la cepa O/UK/01 del VFA. Durante 10 días todos los animales desafiados con el VFA se revisaron diariamente, para registrar la aparición de signos clínicos de infección con VFA (como se describe en la [tabla 3.13](#) de materiales y métodos). A distintos días post-inmunización se tomaron muestras de suero y sangre completa, para la obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), con objeto de evaluar la respuesta humoral y celular inducida por la construcción L-B/N-T.

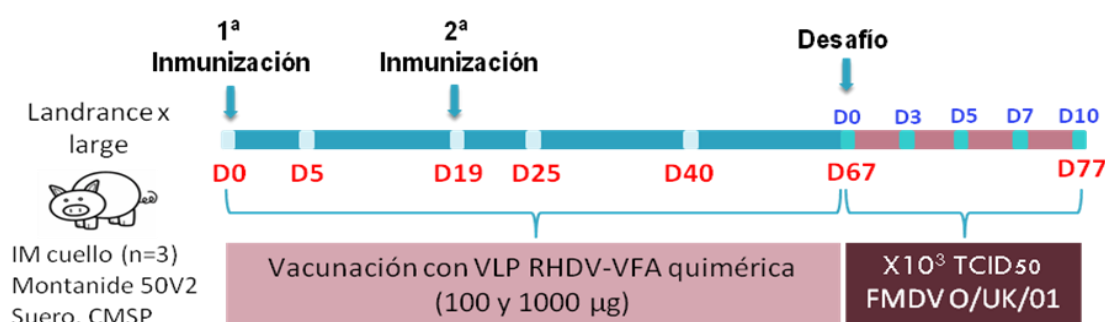


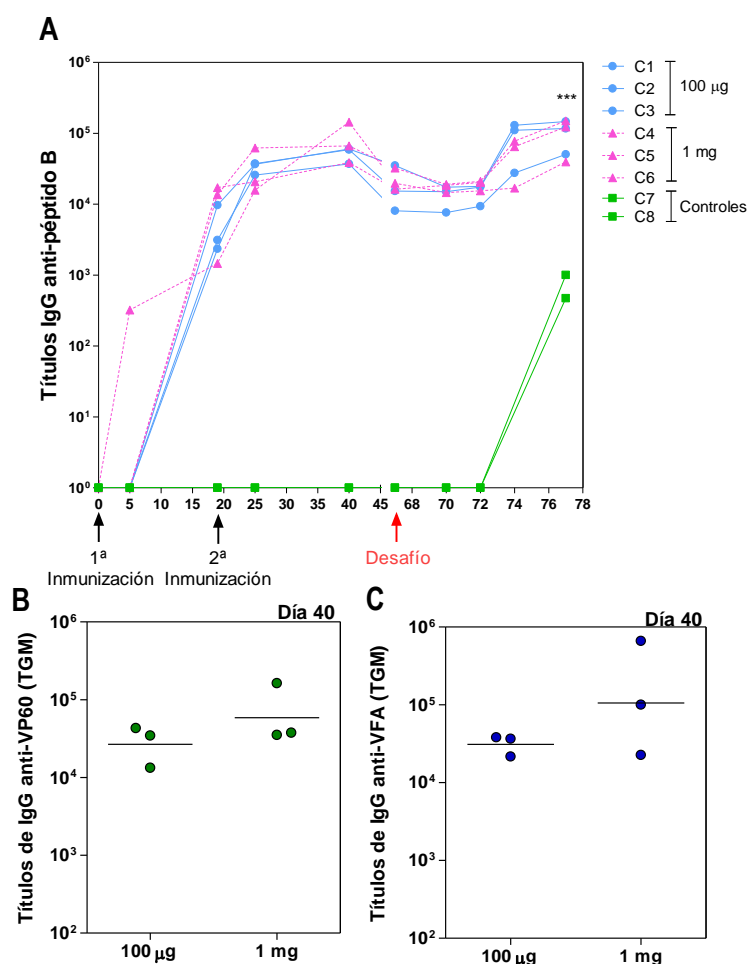
Figura 4.8. Esquema de la inmunización y desafío de cerdos con la VLPs quimérica RHDV-VFA.

4.2.1. Respuesta humoral inducida por la VLP quimérica RHDV-VFA L-B/N-T

La respuesta de Acs frente al epítipo B del VFA inducida en los animales inmunizados con la VLP L-B/N-T se valoró mediante ELISA (empleando un péptido sintético con la secuencia del epítipo B) en sueros obtenidos los días 0, 5, 19, 25, 40, 67, 70, 72, 74 y 77 (Figura 4.9 A). Los títulos de Acs específicos frente a VP60 (empleando VLPs de RHDV como antígeno) y VFA (empleando virus inactivado y purificado como antígeno) se evaluaron en sueros tomados el día 40 (21 días post-boost) (Figura 4.9 B y C). Como era de esperar, todos los sueros pre-inmunes y del grupo control resultaron negativos frente a los tres antígenos evaluados (datos no mostrados), lo que muestra la especificidad de dichos ensayos. Todos los cerdos inmunizados con la VLP quimérica desarrollaron una respuesta de Acs específica y potente frente al epítipo B del VFA (figura 4.9 A), la proteína VP60 (figura 4.9 B) y la partícula viral de VFA (figura 4.9 C).

Tras la administración de una sola dosis de inmunógeno al día 5 post-inmunización, uno de los animales (cerdo 6) presenta títulos de IgGs anti-péptido B de VFA de $2.5 \log_{10}$. El día 19 ya todos los animales inmunizados tienen títulos de IgGs anti-péptido B ($3.7 \pm 0.4 \log_{10}$) (Figura 4.10.A). Tras el boost se aprecia una respuesta anamnésica y los títulos de IgGs se incrementan alrededor de un logaritmo, registrándose títulos máximos de IgGs el D40 ($4.7 \pm 0.2 \log_{10}$). Los títulos de Acs frente a VP60 y VFA se valoraron en los sueros recogidos este día, y como muestra la figura 4.9 B y C, todos los animales inmunizados desarrollaron Acs frente a ambos antígenos. La respuesta frente al VFA correlaciona con los títulos de Acs frente al péptido B detectados y mostrados en la figura 4.9 A. Tras la inoculación del virus, los títulos de Acs totales se mantuvieron en niveles elevados en todos los animales inmunizados, con títulos superiores a los registrados en los dos animales control no inmunizados ($p < 0.005$). Las dos dosis de VLP empleadas para inmunizar los animales (100 y 1000 μg) indujeron una respuesta de Acs anti-péptido B de magnitud similar, sin diferencias estadísticamente significativas en los títulos de Acs.

Figura 4.9. Respuesta humoral inducida en cerdo por VLPs quiméricas de RHDV que presentan epítomos B y T del VFA. (A) Cinética de IgGs totales anti péptido B del VFA valorado mediante ELISA. Las flechas negras indican el día de administración de la primera y segunda dosis de VLP. La flecha roja indica el día en que los animales fueron desafiados con el VFA. Tras el desafío, la diferencia estadísticamente significativa entre el título de IgGs anti-péptido B inducida por la VLP y por el virus en los animales control se muestra como *** ($p < 0.01$). En (B) Títulos de Acs frente a la proteína VP60 valorados el día 40 post-inmunización mediante ELISA. En (C) Títulos de IgGs anti-VFA valorados el día 40 post-inmunización mediante ELISA.



En cuanto al isotipo de los Acs anti-péptido B inducidos por la VLP quimérica, encontramos títulos de IgG1 e IgG2 específicas similares, superiores a 1×10^4 , tanto antes como después de la administración del virus e independientemente de la dosis de inmunógeno probada (Figura 4.10 A y B). La vía aerógena es la ruta de transmisión del VFA más común. Por ello, se decidió examinar el efecto en la respuesta IgA

local y sistémica de la inmunización con la VLP. En sueros recogidos 21 días post-boost, se detectaron IgA específicas frente al péptido B del VFA, aunque con títulos menores a los encontrados para los isotipos IgG1 e IgG2 ($<1 \times 10^4$). En este caso y al contrario que con los isotipos IgG1 e IgG2 que no modificaron su magnitud tras la inoculación con el VFA, los títulos de IgA anti-B se incrementaron alrededor de 1 log tras la administración del virus (Figura 4.10 C). En cuanto a la respuesta de IgA local, solo se detectaron títulos de estos Acs tras la inoculación con el VFA (Figura 4.10 D), pero no tras la inmunización con la VLP quimérica y antes del desafío viral (datos no mostrados).

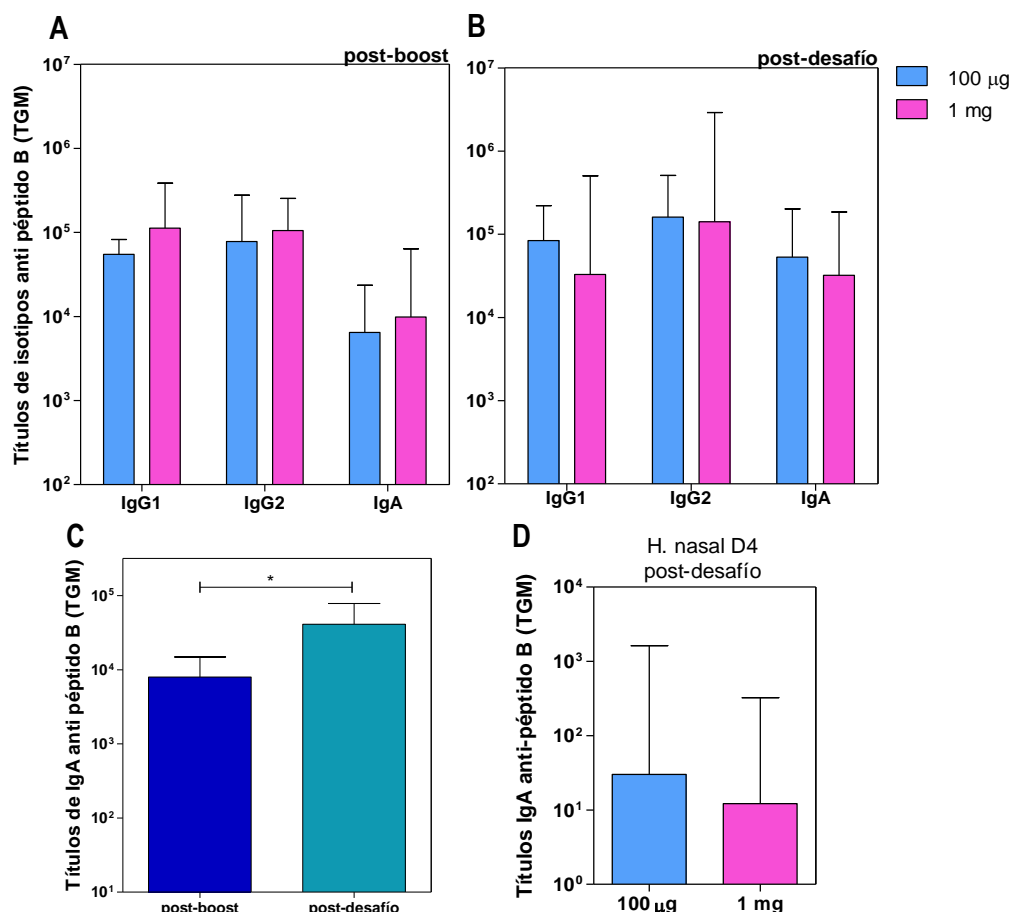


Figura 4.10. Títulos de Acs específicos anti-péptido B (VFA) de las subclases de IgG (IgG1, IgG2) e IgA. Sueros de cerdos inmunizados con la VLP L-B/N-T se analizaron por ELISA para determinar los títulos de Acs frente al epítipo B de VFA de los isotipos indicados, los días 21 post-boost (A) y 10 días post-desafío viral (B). En (C) Los títulos de IgA sistémicos post-boost y post-desafío. En (D) Los títulos de IgA específicos anti-VFA se determinaron en hisopos nasales a D4 post desafío. Las barras representan los TGMs con un CI de 95%.

La respuesta humoral específica anti-VFA se valoró también mediante ensayos de seroneutralización, en sueros recogidos los días 0, 19, 25, 40, 67 y 77 post-inmunización (Figura 4.11). En correlación con la respuesta de Acs detectada por ELISA, todos los animales inmunizados con la VLP L-B/N-T, presentan títulos altos ($\geq 2.5 \log_{10}$) de AcsN frente a la cepa viral O UK/01 del VFA (figura 4.11). Tras la administración de una sola dosis de inmunógeno (Día 19), los cerdos inmunizados desarrollan títulos de AcsN $\geq 1.5 \log_{10}$ (1.95 ± 0.36). La administración del boost (Día 40), provoca un incremento estadísticamente significativo (** $p < 0.01$) del título de AcsN frente al VFA, alcanzando valores medios de

$3.04 \pm 0.3 \log_{10}$. Tras la inoculación con VFA, estos títulos de AcsN se incrementan alrededor de 1 log ($p < 0.001$), alcanzando títulos máximos de 3.56 ± 0.1 . Estos títulos de AcsN en los cerdos inmunizados con la VLP L-B/N-T son significativamente ($p < 0.01$) más elevados que los desarrollados por los animales del grupo control después del desafío viral 2.95 ± 0.07 (d10pd).

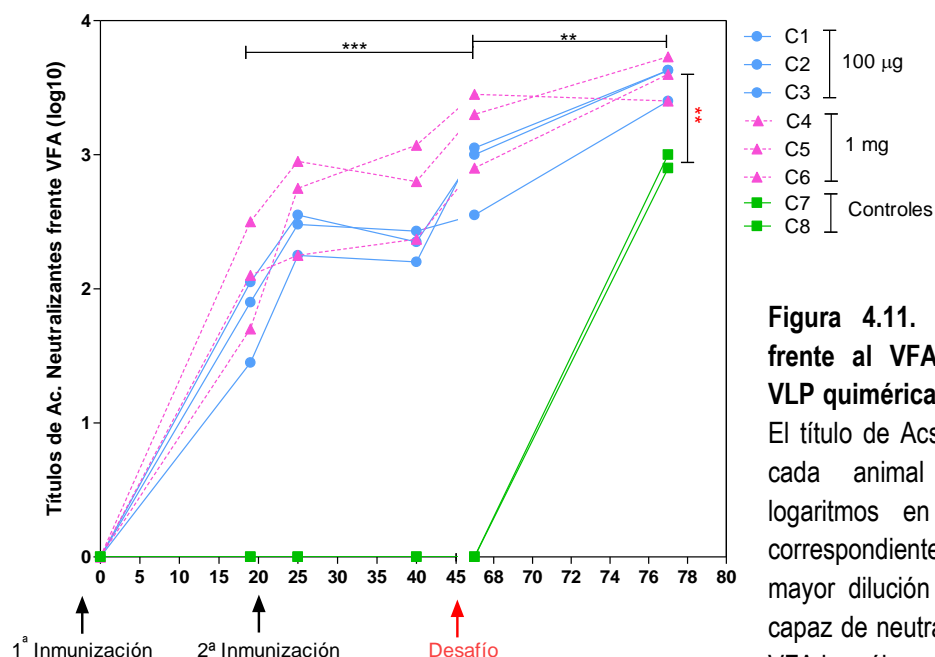


Figura 4.11. Cinética de AcsN frente al VFA inducidos por la VLP quimérica L-B/N-T en cerdos. El título de AcsN determinado para cada animal se expresa en logaritmos en base 10 (\log_{10}), correspondientes al valor de la mayor dilución de suero ensayada capaz de neutralizar 100TCID₅₀ del VFA homólogo.

Las flechas negras indican los días en que se administraron la primera y segunda dosis de VLP, y la flecha roja indica el día de desafío de los animales con el VFA. Las diferencias del título de AcsN estadísticamente significativas entre los animales inmunizados tras la administración de una dosis, del boost y del desafío viral, se indican con ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$). La diferencia del título de AcsN estadísticamente significativa entre los animales inmunizados y los animales control (no inmunizados con VLP), 10 días post-desafío, se indican con el símbolo *, correspondiente a un $p < 0.01$.

4.2.2. Respuesta celular inducida por la VLP quimérica RHDV-VFA L-B/N-T

Se realizó un ensayo de ELISPOT-IFN γ con el objetivo de cuantificar el número de CMSP secretoras de esta citoquina, en respuesta a la estimulación *in vitro* con el péptido B, T y VFA, como indicador de activación de respuesta celular T específica frente al VFA. Como control, también se incluyó en este ensayo la estimulación *in vitro* con VP60. Los ensayos de ELISPOT se realizaron con CMSP recogidas los días 5, 19, 25 y 40 post-inmunización. La inmunización con la VLP quimérica L-B/N-T indujo un número significativo de células secretoras de IFN γ (> 20 por millón de células) en respuesta a la estimulación con la proteína VP60 (Figura 4.12). Esta respuesta comenzó ya a ser detectable el D5 post-inmunización en los cerdos inmunizados con 1 mg de VLPs, pero no en los animales inmunizados con la dosis más baja (100 μ g). El D25 post-inmunización (6 días post-boost) se detectó el pico máximo de células productoras de IFN γ en respuesta a VP60. En contraste con esta respuesta, la inmunización con la VLP L-B/N-T indujo valores muy bajos de células productoras de IFN γ en respuesta a los antígenos de VFA (péptido B, T y virus).

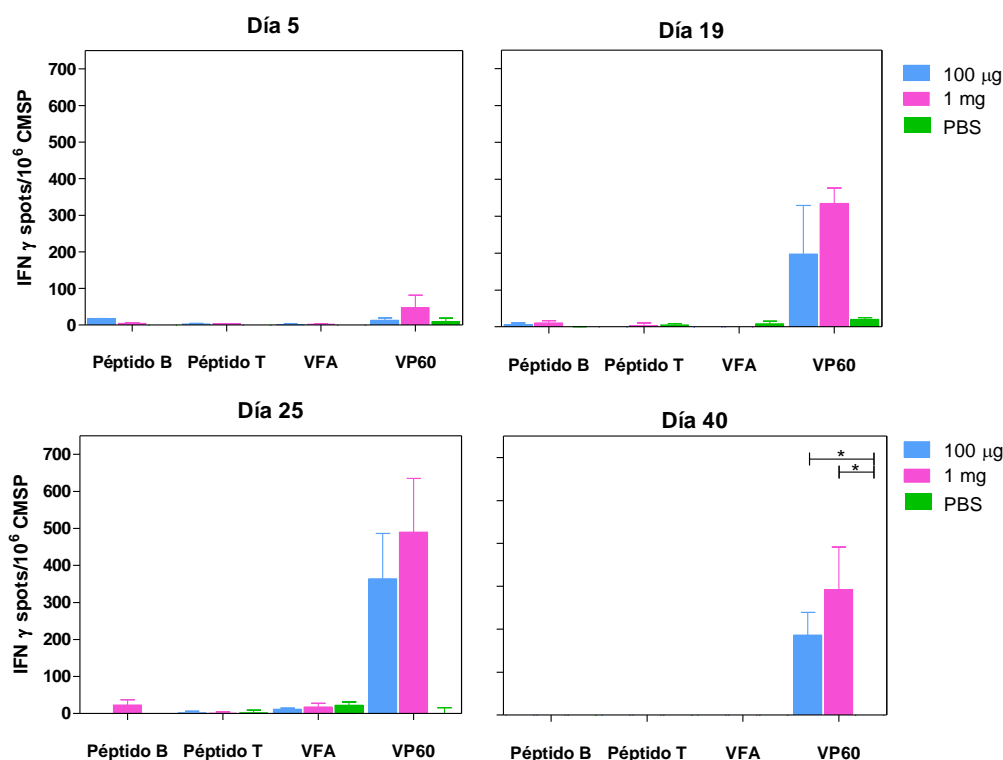


Figura 4.12. Respuesta celular específica desarrollada en cerdos inmunizados con VLP quimérica RHDV-VFA. Frecuencia de células productoras de IFN γ específicas frente a los estímulos indicados, inducida por la VLP quimérica en los animales inmunizados, los días 5, 19, 25 y 40 post-inmunización. Las barras representan la media del número de células productoras de IFN γ /por millón de CMSP frente a cada estímulo, en los grupos de animales inmunizados con 100 μ g (celeste), 1 mg (rosa), o en los controles no inmunizados (morado). La barra de error muestra la desviación estándar de la media para cada grupo. Las diferencias en el número de células productoras de IFN γ frente a VP60, estadísticamente significativas entre los grupos inmunizados con respecto al control se muestran como: * ($p < 0.05$).

Como otro parámetro de análisis de la respuesta celular específica, la respuesta inmune linfoproliferativa inducida por la VLP L-B/N-T en los cerdos inmunizados, se valoró estimulando *in vitro* con los péptidos B y T del VFA, con el VFA y con la proteína VP60, en CMSP recogidas de estos animales el D19 del experimento. Para ello las CMSP, se estimularon *in vitro* con los péptidos B y T del VFA y con la proteína VP60. No se detectaron respuestas linfoproliferativas significativas ($IE > 2$) o estas fueron bajas ($IE < 3$) con las CMSP de los cerdos control, estimuladas con los péptidos del VFA (B y T) y la proteína VP60 (figura 4.13). Sólo se detectó actividad linfoproliferativa significativa frente al péptido B ($IE \geq 3$) y la proteína VP60 ($IE \geq 6$) con CMSP de los cerdos inmunizados con la VLP L-B/N-T, pero no frente al péptido T de VFA (figura 4.13).

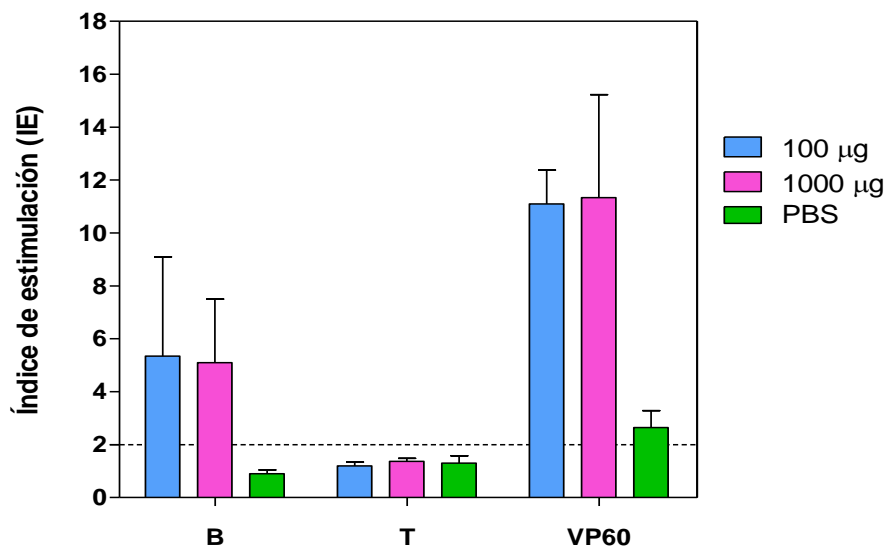


Figura 4.13. Respuesta proliferativa de CMSP estimuladas *in vitro* con los péptidos B y T de VFA y la proteína VP60. CMSP tomadas el D19 del experimento, de los cerdos inmunizados con distintas dosis del VLP RHDV-VFA y los no inmunizados, se estimularon *in vitro* con 10 µg/pocillo de los péptidos B, T y la proteína VP60. Los resultados se expresan como índices de estimulación (IE), donde las barras de error corresponden a la desviación standard. La línea horizontal punteada indica el nivel por encima del cual se considera la respuesta significativa ($IE \geq 2$). Las cpm encontradas frente a medio (control basal de la respuesta) fueron en todos los casos inferiores a 1100.

4.2.3. Protección frente al VFA conferida por la VLP quimérica RHDV-VFA L-B/N-T

Después de la inoculación con el virus homólogo, se evaluaron clínicamente los cerdos durante 10 días para registrar la manifestación de lesiones y la sintomatología, indicativas del desarrollo de la enfermedad de fiebre aftosa, y se cuantificaron mediante un sistema de puntuación descrito en materiales y métodos. Los animales del grupo control (no inmunizados) registraron temperaturas corporales por encima de 39.5°C desde el día 3 post-desafío. En estos animales se desarrollaron múltiples vesículas generalizadas en todas las extremidades además de en la cavidad oral y morro. Entre los animales inmunizados, sin embargo, solo dos presentaron un pico de fiebre (>40°C) al día 7 post-desafío. Todos ellos desarrollaron al menos un afta en las extremidades diferente al punto de inoculación, indicativo de la diseminación del virus más allá del punto de inoculación. Estas lesiones se observaron a partir del día 7 post-desafío, y por tanto de forma claramente retardada en comparación con los animales control que las desarrollaron a partir del día 3 post-desafío. Teniendo en cuenta las puntuaciones clínicas, se observó que en los animales inmunizados con la VLP L-B/N-T las lesiones aparecieron con un retraso de 3 días respecto de los animales control (Figura 4.14 A).

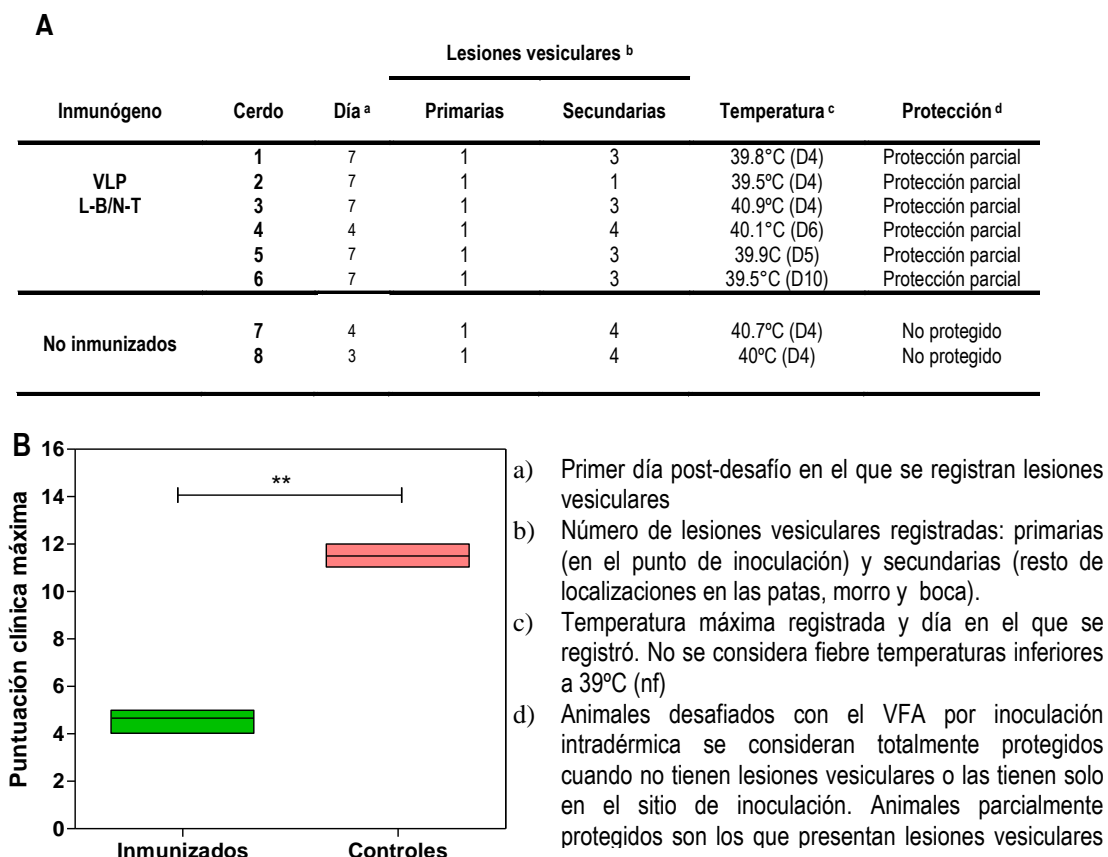


Figura 4.14. Evaluación clínica de los cerdos inmunizados con VLP RHDV-VFA y sus controles tras la inoculación con VFA. (A) Tabla que registra los síntomas desarrollados por los animales post-desafío. (B) Diagrama de caja que muestra el rango de las puntuaciones clínicas máximas registradas para los 6 animales inmunizados (verde) y los 2 controles (rojo) después de la administración del virus con una dosis de inoculación de 10^3 TCID₅₀ de la cepa O/ UK/01 del VFA. La puntuación clínica tiene un máximo de 16 puntos que incluye el desarrollo de aftas en distintas localizaciones, fiebre (temperatura $\geq 39.5^\circ\text{C}$) y otros síntomas como inapetencia, cojera, etc. La diferencia estadísticamente significativa de (B) entre los grupos inmunizados y control, se indican como: ** ($p < 0.01$).

El valor máximo promedio de lesiones registradas en los animales control no inmunizados fue de 11.5 ± 0.7 , mientras que este valor en los animales inmunizados con la VLP L-B/N-T fue significativamente ($p < 0.01$) menor: 4.66 ± 0.57 (Figura 4.14 B).

Además del seguimiento clínico de los animales, tras la inoculación se analizó la viremia del VFA en muestras de suero y plasma recogidas los días 2, 4, 7 y 10 post-desafío. Para ello se evaluó la presencia de virus infectivo en dichas muestras, realizando un aislamiento viral en células IBRS como se describe en materiales y métodos. Sólo se logró aislar virus de muestras de suero y plasma de los cerdos del grupo control (C7 y C8) al día 2 post-desafío, con títulos de 2.3×10^2 pfu/ml y 1.2×10^3 pfu/ml respectivamente.

Estos resultados indican que la VLP L-B/N-T es capaz de conferir protección parcial frente al desafío con el VFA, caracterizada por un retraso en la aparición de lesiones y una menor severidad de las mismas.

En conjunto estos resultados muestran que la VLP quimérica RHDV-VFA L-B/N-T es capaz de inducir en cerdo una respuesta humoral potente frente al virus, incluyendo la producción de AcsN. Esta respuesta confiere protección parcial frente al desafío viral homólogo, retrasando la aparición de los síntomas de la enfermedad de la fiebre aftosa, además de disminuir significativamente la gravedad de las lesiones en el cerdo.

4.3. Inmunogenicidad inducida por una VLP quimérica RHDV-VFA que presenta una versión elongada del epítipo T del VFA

4.3.1. Generación y caracterización de la VLP quimérica RHDV-VFA L-B/N-T2

Con objeto de evaluar si la respuesta celular específica frente al VFA inducida por la VLP quimérica RHDV-VFA L-B/N-T podría mejorarse, se generó un mutante de inserción que incorpora una nueva versión del epítipo T de VFA, denominada T2, elongada por su extremo C-terminal. Esta modificación permite añadir a la construcción quimérica, un epítipo T del VFA adicional al utilizado en las construcciones anteriores, que comprende los aa 26-40 de la proteína 3A. Este epítipo T se identificó previamente en nuestro laboratorio como inmunodominante y promiscuo en poblaciones de cerdo doméstico [148]. Siguiendo la misma aproximación descrita en el apartado anterior, se generó un rBV que expresa el mutante de inserción de la proteína VP60 denominado L-B/N-T2 (Figura 4.15). La secuencia AAIEFFEGMVHDSIKEELRPLIQQ (24 aa) , contiene dos epítipos T del VFA consecutivos, que abarcan las posiciones [21-35] y [26-40] de la proteína 3A y que solapan en 10 aa. Esta secuencia se incorporó en el extremo N-terminal de VP60, flanqueada por los aa flexibles GS.

Así mismo, la nueva VLP quimérica incorpora el epítipo B (PVTNVRGDLQVLAQKAART) de VFA en la posición 306 expuesta (Loop 1) de la proteína VP60.

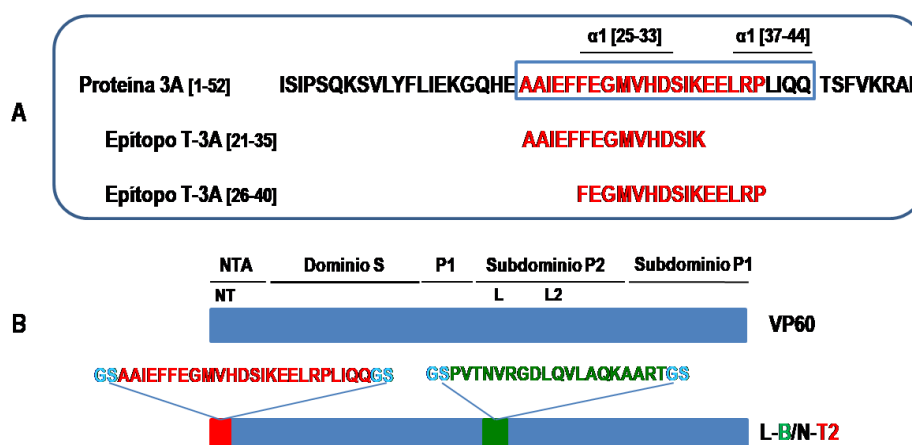


Figura 4.15. Representación esquemática del mutante de inserción de la proteína VP60 que incorpora el epítipo B y la versión elongada del epítipo T de VFA. (A) Secuencia de los epítipos T identificados en la proteína 3A presentados por la VLP quimérica L-B/N-T2. (B) Esquema del mutante de inserción de la proteína VP60 generado. A la derecha se muestra el nombre de la construcción. La barra horizontal celeste

representa la proteína VP60 de RHDV y sobre ella se presenta el epítipo B (verde) inserto en el bucle L y el epítipo T2 (rojo), inserto en el extremo N-terminal de VP60

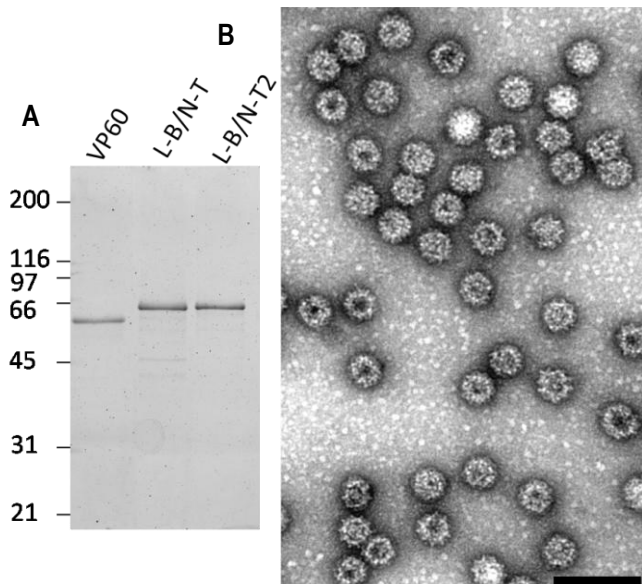


Figura 4.16. Análisis de los mutantes de inserción de la proteína VP60 que incorporan el epítipo B y la versión elongada del epítipo T de VFA. A) Las muestras de las proteínas quiméricas purificadas se analizaron por SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. A la izquierda se indica la posición de los marcadores de peso molecular. La proteína VP60 parental se llevó en paralelo en todos los análisis. B) Análisis por microscopía electrónica del mutante de inserción de VP60 que incorpora el epítipo B y la versión elongada del epítipo T de VFA. Se muestra el análisis por tinción negativa de preparaciones purificadas de las VLPs recombinantes indicadas.

Se determinó si la nueva construcción quimérica conservaba la capacidad de ensamblarse en forma espontánea mediante tinción negativa de la proteína purificada (Figura 4.16). Dicho análisis reveló que la VLP L-B/N-T2, al igual que la construcción anterior L-B/N-T, es capaz de auto-ensamblarse dando lugar a VLPs con un diámetro aproximado de 40 nm, morfológicamente similares a las VLPs formadas por VP60.

4.3.2. Respuesta humoral y celular inducida en ratón por la VLP quimérica RHDV-VFA L-B/N-T2

Grupos de 10 ratones de la cepa Swiss ICR-CD1, se inmunizaron por vía SC con 100 µl de la emulsión que contenía las VLPs quiméricas L-B/N-T y L-B/N-T2. Como controles se incluyeron dos grupos, uno inmunizado con la VLP parental (VP60) y otro con PBS-V. Todos los grupos recibieron una segunda dosis (boost) el día 21 post-inmunización. El día 8 post-boost (pb) 5 ratones de cada grupo fueron sacrificados y los 5 restantes al día 35 pb (figura 4.17). Se tomaron sueros de cada ratón al día 0 y el día del sacrificio y se analizaron mediante ELISA y seroneutralización para cuantificar la respuesta de Acs frente al VFA. La respuesta celular se analizó mediante ensayos de ELISPOT-IFN γ estimulando *in vitro* esplenocitos de cada ratón obtenidos al día del sacrificio, con los diferentes péptidos.

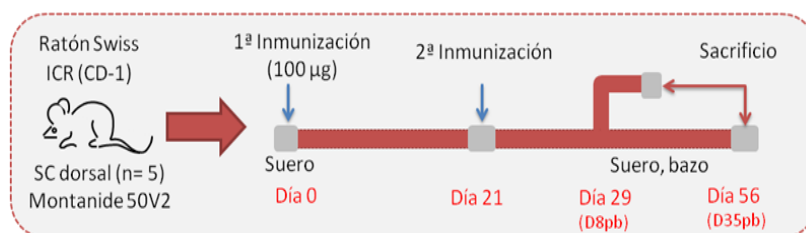


Figura 4.17. Esquema de la inmunización de ratones con las VLPs quiméricas RHDV-VFA

Los sueros obtenidos se analizaron por ELISA para detectar Acs (IgGs) frente a la proteína VP60 (empleando VLPs de RHDV como antígeno) y frente al epítipo B VFA (empleando un péptido sintético con la secuencia del epítipo B). Se determinó el título geométrico medio (TGM) de cada grupo de ratones analizado. Todos los sueros pre-inmunes y el grupo control negativo (PBS-V) resultaron negativos para IgGs frente a los dos antígenos analizados (datos no mostrados). Todos los ratones inmunizados con VLPs derivadas de RHDV (tanto la VLP parental como las quiméricas) desarrollaron títulos altos de Acs anti-VP60 (Figura 4.18 A). Todos los ratones inmunizados con esta colección de VLPs quiméricas, desarrollaron títulos altos de Acs específicos anti-péptido B (Figura 4.18 B), mientras que los sueros de los ratones inmunizados con VP60 resultaron negativos (datos no mostrados). No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

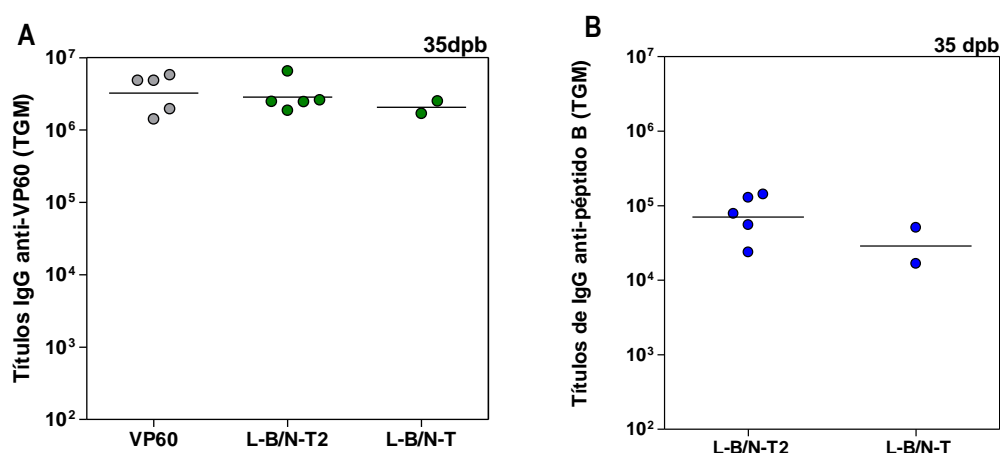
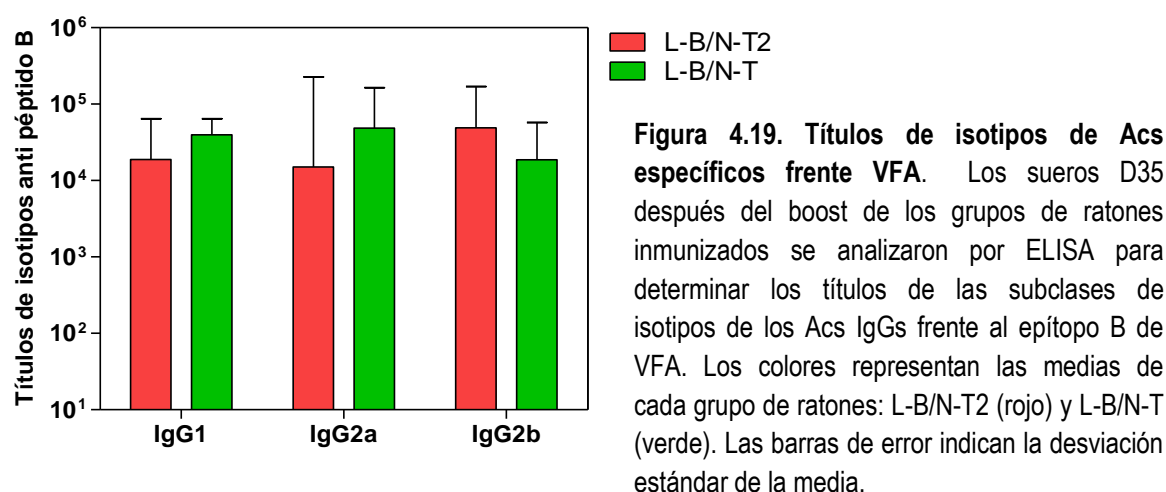


Figura 4.18. Respuesta humoral inducida por VLPs RHDV-VFA en ratones. Los sueros de los grupos de ratones inmunizados se analizaron por ELISA para determinar los títulos de Acs IgGs frente a la proteína VP60 (A) y al epítipo B de VFA en muestras tomadas al D35 después del boost (B). En (A y B) se muestran los datos que resultaron positivos para cada uno de los animales analizados y la línea horizontal representa la media geométrica de cada grupo de ratones.

En cuanto al análisis de distribución de subclases de isotipos (IgG1, IgG2a e IgG2b) al 35dpb (Figura 4.19). Los resultados muestran que los grupos inmunizados con L-B/N-T2 y L-B/N-T, inducen una distribución similar de IgG1, IgG2a e IgG2b, no evidenciándose diferencias significativas entre grupos.



Se analizó la presencia y magnitud de actividad neutralizante frente a la infección de células IBRS con el virus VFA inducida por las VLPs quiméricas. Para ello se realizó el ensayo de seroneutralización en presencia de sueros de ratones inmunizados (figura 4.20). Los sueros del grupo control negativo (PBS-V) y los correspondientes con el grupo VP60 no mostraron actividad neutralizante (datos no mostrados). Los sueros de ratones inmunizados con la VLP L-B/N-T2 mostraron actividad neutralizante frente a VFA, a niveles comparables a los obtenidos por otras construcciones portadoras del mismo epítipo B.

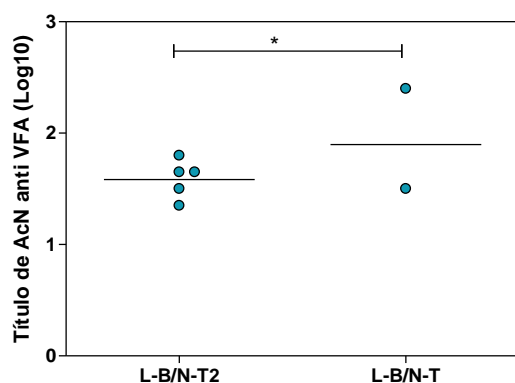


Figura 4.20. Actividad neutralizante frente al VFA inducida por las VLPs RHDV-VFA. El título de AcN determinado 35dpb para cada animal se expresó como el logaritmo en base 10 (\log_{10}) del valor recíproco de la mayor dilución ensayada capaz de neutralizar 100TCID₅₀ del virus homólogo. La línea horizontal representa la media del grupo. La diferencia estadísticamente significativa entre la varianza de ambos grupos se indica como: * ($P<0.05$).

Para detectar células secretoras de IFN γ específicas al estímulo del epítipo T de VFA insertado en las VLPs quiméricas se realizó un ensayo de ELISPOT IFN γ (Figura 4.21). Los resultados muestran la obtención de una respuesta de células T específicas en los esplenocitos del grupo inmunizado con la VLP L-B/N-T2 estimulados con los péptidos T-3A_[21-35] y T3A_[26-40] derivados de la proteína 3A VFA, con un incremento de la respuesta celular específica para VFA en comparación de la VLP L-B/N-T, que incorpora la versión original del epítipo T (3A_[21-35]).

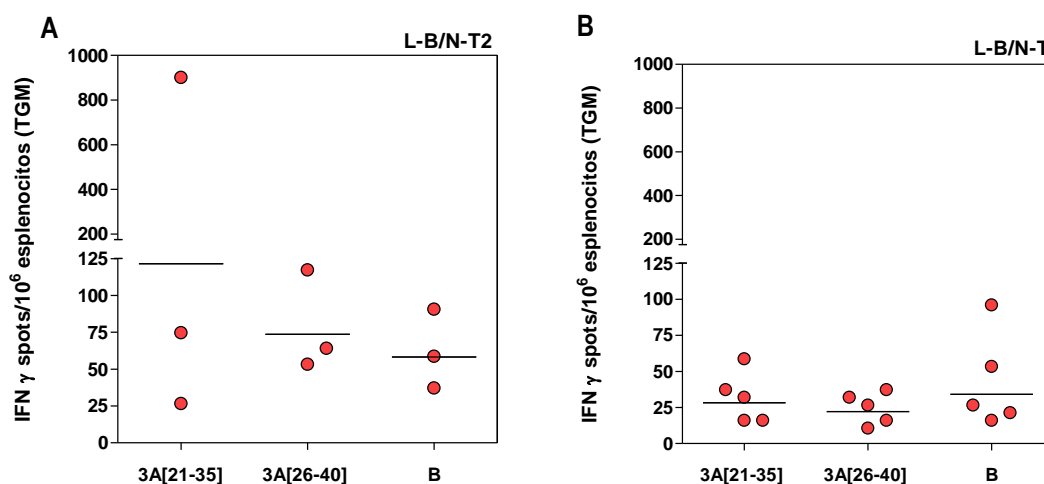


Figura 4.21. Ensayo ELISPOT IFN γ . Frecuencia de células productoras de IFN γ específicos al estímulo del epítipo B, péptidos T (3A_[21-35] y 3A_[26-40]) en ratones inmunizados con la VLPs quimérica L-B/N-T2 (A) y L-B/N-T (B) obtenidos al día 8 post-boost. Los puntos expresan el número de spots/millón de esplenocitos frente a cada estímulo por individuo.

4.3.3. Potenciación de la respuesta inmune de VLP quimérica L-B/N-T2 mediante la incorporación de M8 (ligando de RIG-I) como adyuvante

En miras de evaluar otro adyuvante que mejorase la inducción de una respuesta celular efectora frente al VFA inducida por nuestra estrategia vacunal, exploramos el uso de un agonista RIG-I como adyuvante. La detección de los virus por la respuesta inmune innata, se basa en el reconocimiento de características bioquímicas que se encuentran en los genomas virales y que difieren de los ácidos nucleicos de las células huésped. En el caso de RNAs virales, estas características pueden ser moléculas tri o di fosforilados y falta de 7- metilguanosina. M8 es una molécula de RNA optimizada que contiene trifosfato (5'pppRNA). Está descrito como agonista de RIG-I al estimular las vías de la respuesta inmune innata y cuyo uso como adyuvante alternativo ha sido propuesto en el contexto de la vacunación utilizando VLPs de distinta naturaleza [229, 230]. Nos propusimos evaluar la capacidad adyuvante de M8 para mejorar la inmunogenicidad y protección conferidas por las VLPs RHDV-VFA en comparación al uso de un adyuvante convencional (Montanide). Para ello se inmunizaron ratones de la cepa Swiss ICR CD1 con dosis reducidas de la VLP L-B/N-T2, en presencia como adyuvante de Montanide o M8, siguiendo el esquema de doble inmunización (Figura 4.22).

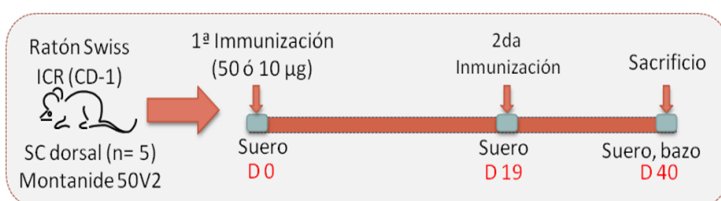


Figura 4.22. Esquema de la inmunización de ratones con VLPs RHDV-VFA en presencia de los adyuvantes montanide y M8

Todos los sueros pre-inmunes y del grupo control PBS resultaron negativos para IgGs frente a los antígenos VP60 y péptido B (datos no mostrados). Ratones inmunizados con la VLP quimérica RHDV-VFA L-B/N-T2 desarrollan una potente respuesta de Acs IgGs totales tanto a la proteína VP60 de RHDV como al epítipo B (Figura 4.23). Los títulos de IgGs específicos frente al péptido B en los grupos inmunizados tanto en presencia de Montanide como de M8 muestran sin embargo diferencias significativas entre grupos con la mayor dosis inmunógeno utilizada, aunque no a la dosis más baja.

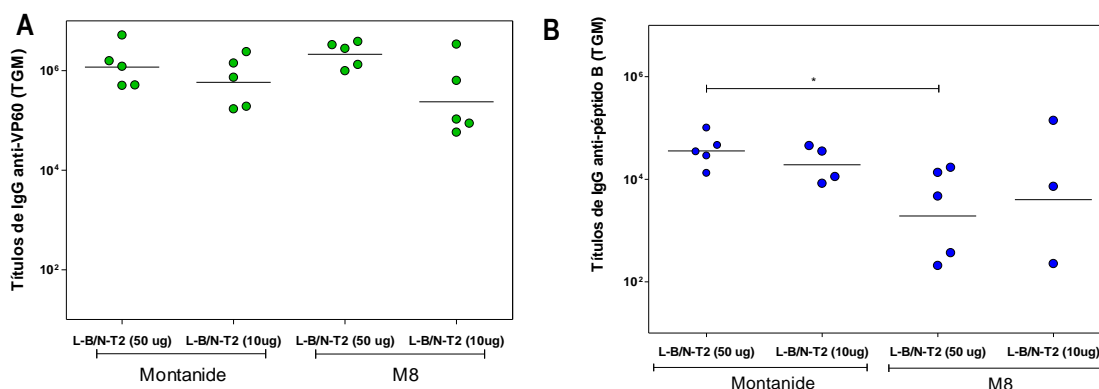


Figura 4.23. Comparación de la respuesta humoral inducida por VLPs RHDV-VFA en ratones en presencia de Montanide o de M8. Los sueros de los grupos de ratones inmunizados se analizaron por

ELISA para determinar los títulos de Acs (IgGs) frente a la proteína VP60 (A) y frente al epítipo B de VFA (B) de muestras tomadas después del boost (D40). En (A y B) se presentan los títulos individuales obtenidos para cada ratón por grupo. La barra horizontal indica la TGM de cada grupo. La diferencia estadísticamente significativas entre los grupos inmunizados con 50 ug de VLP con Montanide o M8, se marcan como: * ($p < 0.05$).

Seguidamente se determinaron los títulos de las subclases de isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b de Acs frente al epítipo B. De nuevo se encontraron diferencias significativas entre los grupos vacunados con la mayor dosis de inmunógeno con Montanide o M8 en las poblaciones de IgG1 e IgG2b. (Figura 4.24).

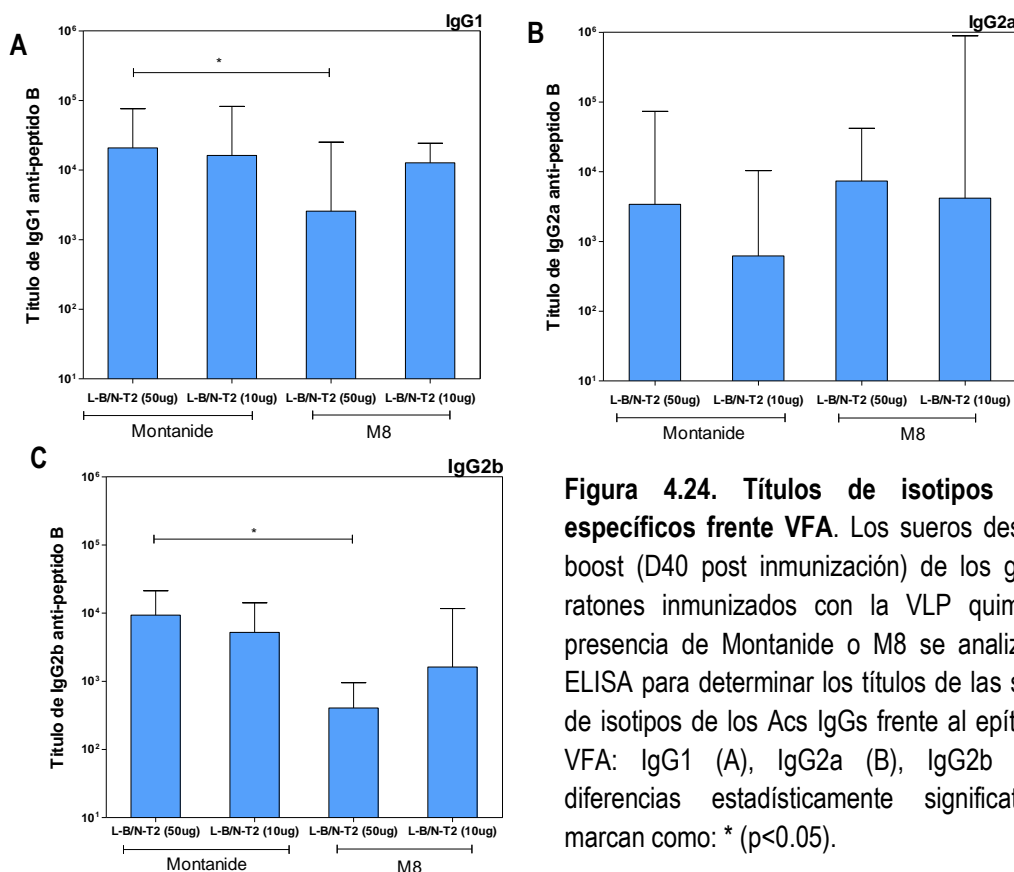
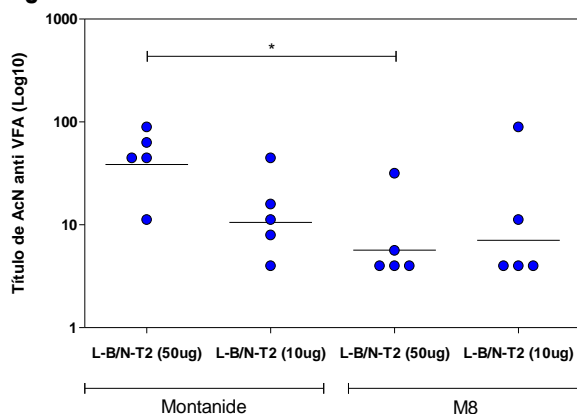


Figura 4.24. Títulos de isotipos de Acs específicos frente VFA. Los sueros después del boost (D40 post inmunización) de los grupos de ratones inmunizados con la VLP quimérica en presencia de Montanide o M8 se analizaron por ELISA para determinar los títulos de las subclases de isotipos de los Acs IgGs frente al epítipo B de VFA: IgG1 (A), IgG2a (B), IgG2b (C). Las diferencias estadísticamente significativas se marcan como: * ($p < 0.05$).

En cuanto a los AcsN (Figura 4.25), los sueros del grupo control negativo (PBS) no mostraron actividad neutralizante tal como se esperaba (datos no mostrados). A día 21 pb ambos grupos inmunizados en presencia de Montanide o M8 desarrollaron AcsN. En este caso, sólo se detectaron diferencias significativas a la mayor dosis de inmunógeno probada entre ambos adyuvantes.

Figura 4.25. Actividad neutralizante frente al VFA inducida por las VLPs RHDV-VFA. El título de



AcsN determinado para cada animal se expresó como el logaritmo en base 10 (\log_{10}) del valor recíproco de la mayor dilución ensayada capaz de neutralizar 100TCID₅₀ del virus homólogo. La línea horizontal representa la TGM del grupo. La diferencia estadísticamente significativa entre los grupos inmunizados con 50 ug de VLP en presencia de Montanide o M8 se indica como: * ($p < 0.05$).

Mediante un ensayo de ELISPOT IFN γ , se determinó la respuesta celular específica al péptido T de VFA. Los resultados al D20pb demuestran que linfocitos primarios obtenidos del bazo de ratones inmunizados con VLP RHDV-VFA, no solo reconocen específicamente los péptidos VFA insertados en nuestra vacuna, sino que también induce la formación de células secretoras de IFN γ . Se refleja una diferencia significativa entre los grupos inmunizados a la mayor dosis de VLPs en presencia de Montanide y el grupo en presencia de M8 (Figura 4.26 A). En todos los casos, la frecuencia de células secretoras de IFN γ es mayor frente al estímulo de VP60 (Figura 4.26 B), la proteína de la cápsida de nuestra estrategia vacunal.

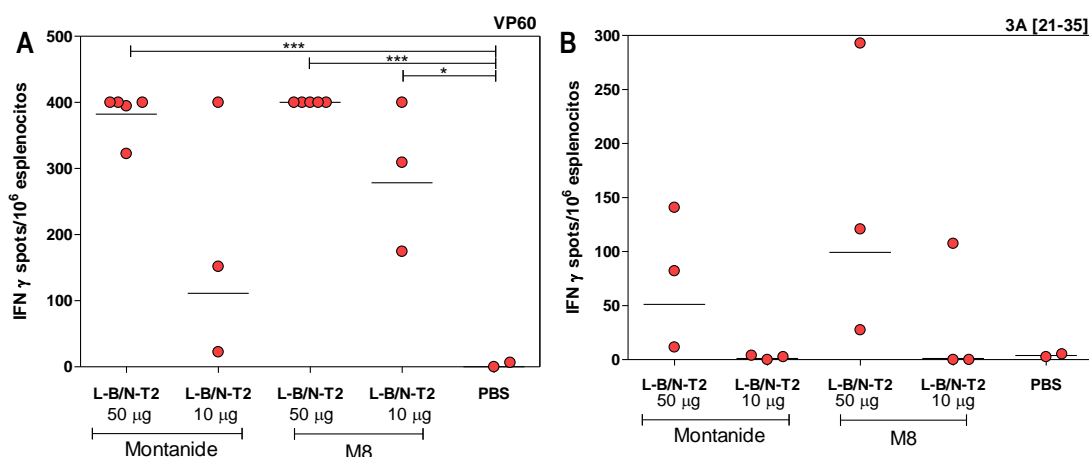
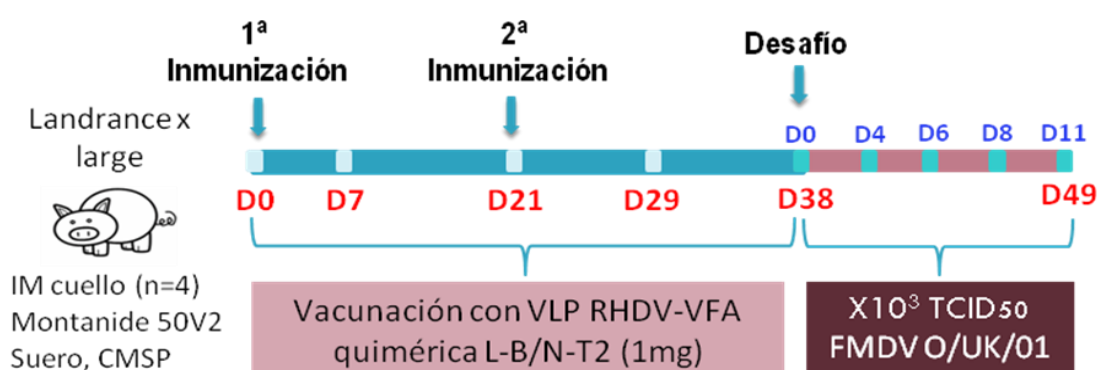


Figura 4.26. Ensayo ELISPOT IFN γ . Células secretoras de IFN γ específicos al estímulo de VP60 (A) y epítipo T (B), en animales inmunizados con la VLP quimérica L-B/N-T2 en presencia de Montanide o M8 como adyuvantes. Las gráficas expresan el número de spots/millón de esplenocitos. Se representan la señal dada por individuo analizado por triplicado. La barra horizontal muestra la TGM de cada grupo. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos inmunizados en presencia de Montanide o M8 con respecto al grupo control (PBS) se indican como: * ($p < 0.05$) y ** ($p < 0.01$).

En conclusión, observamos que el agonista RIG-I es capaz de actuar como adyuvante eficaz y comparable a Montanide *in vivo* en el contexto de la vacunación con VLPs derivadas de RHDV para la inducción de una respuesta celular, pero no para la inducción de una respuesta humoral con actividad neutralizante.

4.3.4. Protección frente al VFA conferida por la VLP quimérica RHDV-VFA L-B/N-T2

Cuatro cerdas de raza Landrace x Large White de 7-8 semanas de edad, fueron inmunizadas por vía IM con 1000 µg de VLP RHDV-VFA L-B/N-T2 en un volumen final de 2 ml, emulsionadas en Montanide 50V2. Fueron incluidos un grupo control compuesto por 2 animales inmunizados con la VLP parental (VP60) y PBS respectivamente. El programa de vacunación consistió en dos dosis, con un intervalo de 20 días. Las muestras de sangre fueron tomadas al D0 del experimento, antes y después del boost (2da inmunización). A los 17 días post boost, todos los animales fueron llevados a las instalaciones del CISA (Animalario P3) y se inocularon intradérmicamente en el rodete coronario con 10^3 TCID₅₀ del VFA serotipo O UK/01. Durante 10 días se revisaron los animales diariamente, registrando temperatura y aparición de signos clínicos de la enfermedad de Fiebre Aftosa (Figura 4.27). Muestras de sangre fueron tomadas a intervalos de 2 días durante el tiempo post inoculación.



4.27. Esquema de la inmunización y desafío de cerdos con la VLPs quimérica RHDV-VFA

La respuesta de Acs frente al epítipo B del VFA inducida en los animales inmunizados con la VLP L-B/N-T2 se valoró mediante ELISA (empleando un péptido sintético con la secuencia del epítipo B) en sueros obtenidos los días 0, 7, 21, 29, 38, 42, 44, 46 y 49 (Figura 4.28 A). Los títulos de Acs específicos frente a VP60 (empleando VLPs de RHDV como antígeno) se evaluaron en sueros tomados el día 38 (Figura 4.28 B) y VFA (empleando virus inactivado y purificado como antígeno) se evaluaron en sueros tomados el día 11 post-desafío (pd) (Figura 4.28 C). Todos los sueros pre-inmunes y del grupo control PBS resultaron negativos para IgGs frente a los antígenos VP60 y péptido B (datos no mostrados). Todos los cerdos inmunizados con la VLP quimérica L-B/N-T2 desarrollaron una respuesta de Acs específica y potente frente al epítipo B del VFA (Figura 4.28 A), la proteína VP60 (Figura 4.28 B) y la partícula viral de VFA (Figura 4.28 C). Tras la administración de una sola dosis de inmunógeno al día 7 post-inmunización, todos los animales presentan títulos de IgGs anti-péptido B de VFA de $2.1 \pm 0.2 \log_{10}$. El día 21 los títulos de IgGs anti-péptido B aumentan a una media $3.2 \pm 0.4 \log_{10}$. Después del boost se aprecia una respuesta anamnésica y los títulos de IgGs se incrementan alrededor de un logaritmo, registrándose títulos máximos de IgGs el D38 de $4.2 \pm 0.3 \log_{10}$. (Figura 4.10.A). Los títulos de Acs frente a VP60 se

valoraron en los sueros recogidos este día, y como muestra la Figura 4.28 B, todos los animales inmunizados desarrollaron Acs frente a la proteína VP60. Tras la administración del virus, en los animales del grupo inmunizado con VLP L-B/N-T2, los títulos de estos Acs se mantuvieron en niveles elevados $4.5 \pm 0.3 \log_{10}$. No se detectaron títulos de IgGs específicos al péptido B en los controles infectados tras el desafío. Sin embargo, se evaluaron los títulos frente VFA con sueros obtenidos el último día post-desafío (11dpd), donde tanto los animales inmunizados como desafiados reconocen el VFA (Figura 4.28 C).

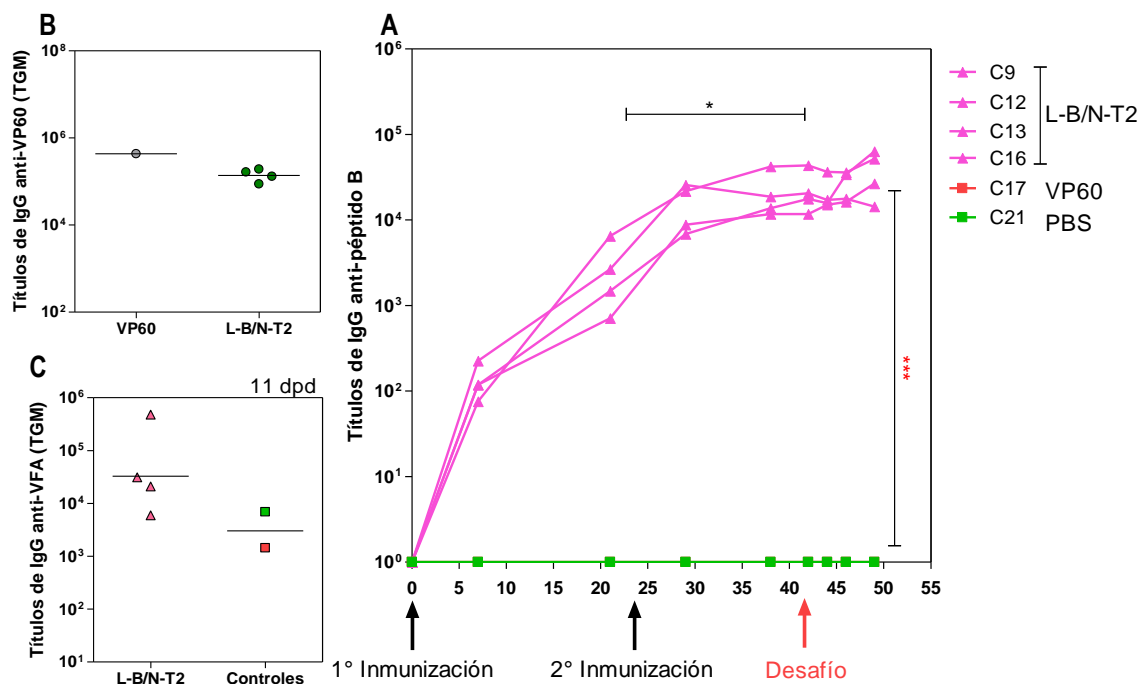


Figura 4.28. Respuesta humoral inducida en cerdo por VLPs quiméricas de RHDV que presentan epítomos B y T2 del VFA. (A) Cinética de IgGs totales anti péptido B del VFA valorado mediante ELISA. Las flechas negras indican el día de administración de la primera y segunda dosis de VLP. La flecha roja indica el día en que los animales fueron desafiados con el VFA. En (B) Títulos de Acs frente a la proteína VP60 valorados el día 38 post-inmunización mediante ELISA. En (C) Títulos de IgGs anti-VFA valorados el día 11 post-desafío mediante ELISA. Las diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de animales inmunizados antes y después del boost, se identifica como * ($p < 0.05$) y entre los títulos desarrollados 11dpd de los animales inmunizados en comparación con los controles se muestran como: *** ($p < 0.001$).

La respuesta humoral específica anti-VFA se valoró también mediante ensayos de seroneutralización, en sueros recogidos los días D0, D21, D29; D38y D49 post-inmunización (Figura 4.29). En correlación con los títulos de Ac detectados por ELISA, los animales inmunizados con la VLPs RHDV-VFA L-B/N-T2, presenta títulos altos de AcsN frente a VFA serotipo O cepa OUK/01 de $2.8 \pm 0.5 \log_{10}$ (Figura 4.29). Tras la administración de una sola dosis de inmunógeno (Día 21), los cerdos inmunizados desarrollan títulos de AcsN $\geq 1.5 \log_{10}$ (1.6 ± 0.3). La administración del boost (Día 38), provoca un incremento estadísticamente significativo (* $p < 0.05$) del título de AcsN frente al VFA, alcanzando valores medios de

$2.52 \pm 0.25 \log_{10}$. Tras la inoculación del virus, los títulos de AcsN en los cerdos inmunizados con la VLP L-B/N-T2 son similares que los desarrollados por el grupo control.

En conjunto estos resultados indican que las VLPs quiméricas que presentan los epítomos del VFA son capaces de inducir una potente respuesta específica de Ac (incluyendo la inducción de AcsN) frente al epítomo B de VFA, en uno de sus hospedadores naturales, como es el cerdo.

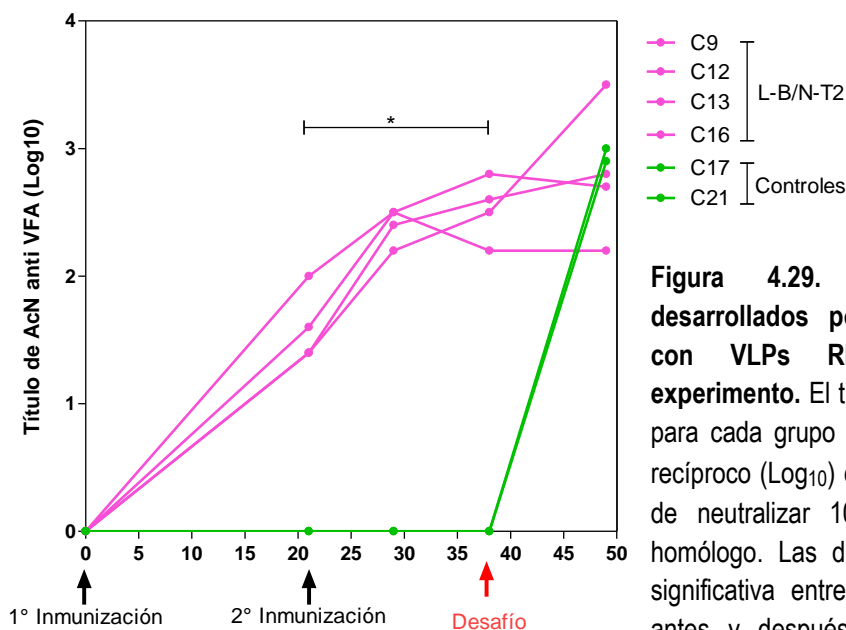
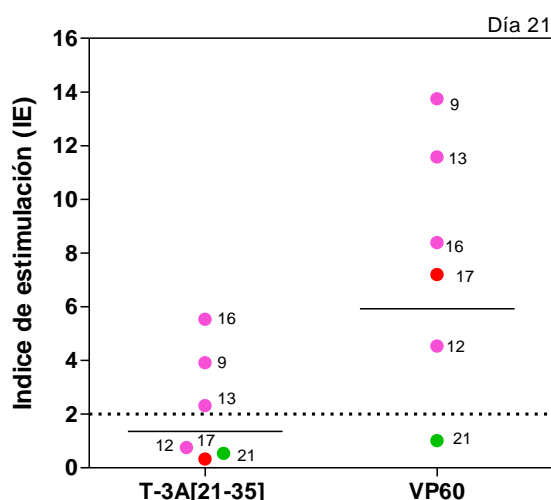


Figura 4.29. Cinética de AcsN desarrollados por cerdos inmunizados con VLPs RHDV-VFA durante el experimento. El título de AcsN determinado para cada grupo se expresó como el valor recíproco (\log_{10}) de la última dilución capaz de neutralizar 100TCID₅₀ frente al virus homólogo. Las diferencia estadísticamente significativa entre los grupos inmunizados antes y después del boost se identifica como: * ($p < 0.05$).

Como parámetro de análisis de la respuesta celular específica, la respuesta inmune linfoproliferativa inducida por la VLP L-B/N-T2 en los cerdos inmunizados, se valoró estimulando *in vitro* con el péptido T 3A_[21-35] del VFA y con la proteína VP60, en CMSP recogidas de estos animales el D21 del experimento. Para ello las CMSP, se estimularon *in vitro* con el péptido T del VFA y con la proteína VP60. No se detectaron respuestas linfoproliferativas significativas ($IE > 2$) con las CMSP del cerdo control (C21), estimuladas con el péptido T y la proteína VP60 (Figura 4.30). Sólo se detectó actividad linfoproliferativa significativa frente al péptido T ($IE \geq 3$) en 3/4 animales inmunizados (C9, C13 y C16) y la proteína VP60 con una media $IE \geq 6$ con CMSP de los cerdos inmunizados con la VLP L-B/N-T2 (C9, C12, C13 y C16) y el control inmunizado con VP60 (C17) (Figura 4.30).

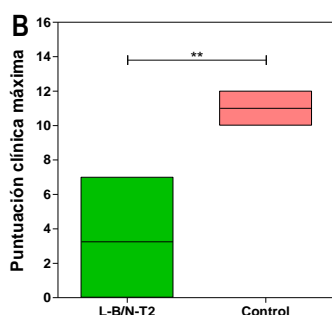
Figura 4.30. Respuesta proliferativa de CMSP estimuladas *in vitro* con el péptido T de VFA y VP60.



CMSP tomadas el D21 del experimento, de los cerdos inmunizados con VLP RHDV-VFA L-B/N-T2 (puntos rosas), inmunizado con VP60 (punto rojo) y no inmunizado (Punto verde), se estimularon *in vitro* con 10 µg/pocillo del péptido T y la proteína VP60. Los resultados se expresan como índices de estimulación (IE), donde las barras de error corresponden a la desviación standard. La línea horizontal punteada indica el nivel por encima del cual se considera la respuesta significativa ($IE \geq 2$). Las cpm encontradas frente a medio (control basal de la respuesta) fueron en todos los casos inferiores a 1100.

Después de la inoculación del virus homólogo, se evaluaron los cerdos durante 11 días para registrar la manifestación de lesiones y sintomatología indicativo del desarrollo de la enfermedad de fiebre aftosa mediante un sistema de puntaje. Dos de los cerdos inmunizados con la VLPs L-B/N-T2 registraron una protección completa, y los otros 2 cerdos inmunizados una protección parcial, caracterizada por un retardo en la presentación de lesiones típicas de la infección con el VFA y una disminución de la severidad de los síntomas descritos para VFA (Figura 4.31).

A	Lesiones vesiculares ^b					
	Inmunógeno	Cerdo	Día ^a	Primarias	Secundarias	Temperatura ^c
VLP LB/NT2		9	6	1	0	nf
		12	6	1	3	39.5°C (D7)
		13	7	1	2	39.4°C (D7)
		16	-	0	0	nf
No inmunizados		17	4	1	4	40.2°C (D6)
		21	4	1	3	40°C (D5)
				Protección ^d		
				Protección total		
				Protección parcial		
				Protección parcial		
				Protección total		



- Primer día post-desafío en el que se registran lesiones vesiculares
- Número de lesiones vesiculares registradas: primarias (en el punto de inoculación) y secundarias (resto de localizaciones en las patas, morro y boca).
- Temperatura máxima registrada y día en el que se registró. No se considera fiebre temperaturas inferiores a 39°C (nf)
- Animales desafiados con el VFA por inoculación intradérmica se consideran totalmente protegidos cuando no tienen lesiones vesiculares o las tienen solo en el sitio de inoculación. Animales parcialmente protegidos son los que presentan lesiones vesiculares menos severas y/o su aparición se retrasa en el tiempo.

Figura 4.31. Análisis clínico post-desafío. (A) Tabla que registra los síntomas desarrollados por los animales post-desafío. (B) Diagrama de caja que muestra el rango de las puntuaciones clínicas máximas registradas para los 6 animales inmunizados (verde) y 2 controles (rojo) después la administración del virus con una dosis de inoculación de 10^3 TCID₅₀ del VFA serotipo O cepa UK/01. El puntaje clínico tiene un máximo de 16 puntos que abarca la presentación de fiebre, síntomas como inapetencia, cojeras y el

desarrollo de aftas. Se indica la diferencia estadísticamente significativa entre los grupos inmunizados y control como: ** ($p < 0.01$).

4.3.5. Caracterización de los AcsN inducidos por la VLP RHDV-VFA: selección de mutantes de escape en cultivos celulares

Para entender la naturaleza de los AcsN frente a VFA inducidos por la inmunización con las VLPs RHDV-VFA *in vivo*, se tomaron sueros de animales inmunizados así como controles relevantes y se utilizaron para obtener mediante pases seriados poblaciones de mutantes virales de escape. Su caracterización debería permitir entender mejor las posiciones específicas del epítipo B utilizado, críticos en la neutralización mediada por estos sueros. Así, se realizaron pases del virus VFA O UK/01 en presencia de cantidades subneutralizantes de los sueros de cuatro animales inmunizados con VLP RHDV-VFA L-B (C1, C4, C5 y C6). Como controles se utilizaron también sueros de animales infectados con VFA pero no inmunizados previamente (C21 y C22) así como sueros de cuatro animales que no contienen Acs (C17 y C18). Tras 10 pases en cultivo en células IBRS, se analizó la secuencia consenso de un fragmento de la proteína VP1 de cada muestra. Mientras que la secuencia de los virus pasados en presencia de sueros no neutralizantes se mantuvo idéntica a la original, entre las demás muestras, se detectaron cambios puntuales de nucleótidos que resultan en cambios de la secuencia codificada tal como se detalla en la Tabla 4.1 Algunos de los cambios detectados se encuentran en posiciones ajenas al péptido B bajo estudio, sugiriendo que se pueden deber al azar. De manera relevante, se han detectado también mutaciones fijadas en la secuencia consenso en dos posiciones distintas, correspondientes al epítipo B en virus obtenidos en presencia de sueros neutralizantes (Figura 4.32).

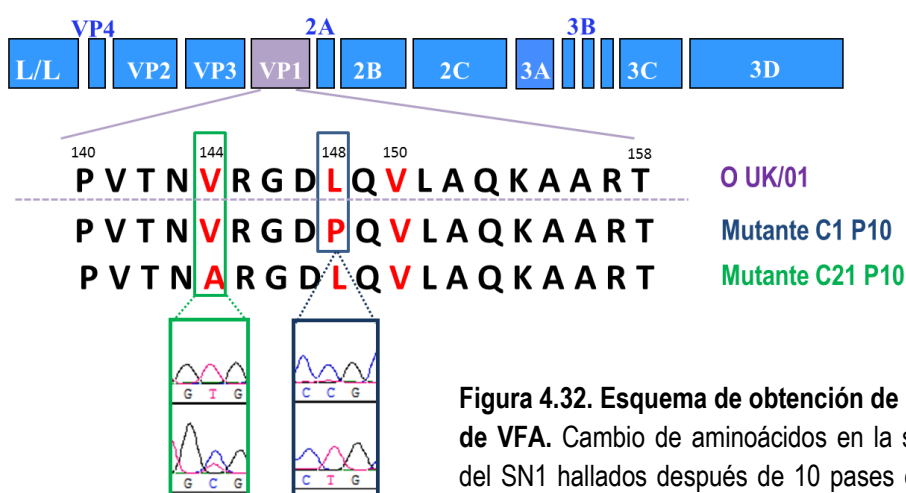


Figura 4.32. Esquema de obtención de mutantes de escape de VFA. Cambio de aminoácidos en la secuencia codificante del SN1 hallados después de 10 pases en cultivo celular. En rojo se marca los En rojo aminoácidos descritos como críticos que afectan la unión a Acs.

El cambio L148P en particular parece estar relacionado con el escape de la neutralización, tal como se deduce de los ensayos de seroneutralización realizados con los virus de pase 10 descritos. Esta mutación aparece también, aunque no fijada, en la secuencia consenso del otro virus que muestra escape de la

neutralización (Tabla 4.1). Estos resultados confirman que la vacunación con las VLP quiméricas RHDV-VFA induce AcsN que pueden actuar bloqueando específicamente el péptido B utilizado como epítipo heterólogo.

Ensayos de seroneutralización con los pases 10 de los virus mutantes, muestran para algunos de los virus cepas (C1, C5 y C6), una reducción del título de neutralización con respecto al título obtenido del virus original.

Tabla 4.1 Descripción de las mutaciones encontradas y la capacidad de escape de la actividad neutralizante en las poblaciones virales seleccionadas en cultivos celulares

Nombre del virus mutante	Secuenciado desde-hasta de la VP1	No. De Mutaciones en la VP1 encontradas	Posiciones de la mutación (aa)	Título AcsN antes de los pases	Título AcsN al pase 10
C1	7-941	3	369-371 (83) GAG→AAG (E → K) 564-566 (148) CTG→CCG (L → P) 636-638 (172) CGG →TGG (R → W)	2.7	1.5
C4	37-941	0		2.6	2.7
C5	50-921	2	369-371 (83) GAG→AAG (E → K) 636-638 (172) CGG→TGG (R → W)	2.4	1.8
C6	54-944	1	369-371(83) GAG→CAG (E → K)	2.7	2.5
C21	55-952	1	552-554 (144) GTG→GCG (V → A)	2.9	3.2
C22	54-941	0		2.5	3.0

Se destacan en amarillo las mutaciones encontradas dentro de la zona codificante del epítipo B

4.4. Utilización de Adenovirus recombinante que expresa la proteína 3D de VFA para la inducción de una respuesta celular efectora *in vivo*

4.4.1. Generación y caracterización de AdV recombinantes que expresan la proteína 3D del VFA

Se ha descrito anteriormente la capacidad de la proteína no estructural 3D de VFA, muy conservada entre serotipos, de inducir una respuesta celular específica frente a la infección viral [149]. Además se le describe como un inmunógeno inmunodominante para células T bovinas [155] y porcinas [149, 156, 157]. En vista de la eficacia de los adenovirus recombinantes (rAdV) como vectores vacunales en la especie porcina, generamos rAdV capaces de expresar la proteína 3D de VFA o una versión mutada de ésta incapaz de unirse a RNA (rAdV-3D y rAdV-3D KAKA) así como un rAdV que expresa la proteína lacZ

como control. Tal como se muestra (Figura 4.33), tanto la proteína 3D como la versión mutada se expresan específicamente en células 293T infectadas con los rAdV(s) correspondientes.

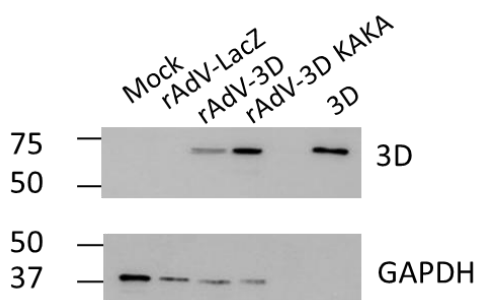
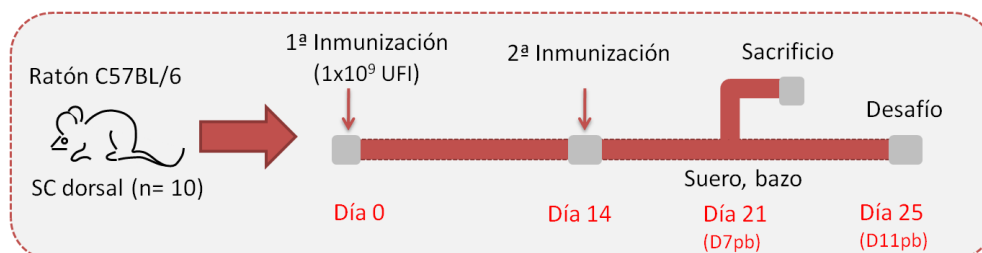


Figura 4.33. Expresión de la proteína 3D de VFA por adenovirus recombinantes. Extractos de células 293T infectadas con los rAdV(s) correspondientes se analizaron por WB empleando el anticuerpo monoclonal (3F12) específico frente a la 3D de VFA. Como control analizó la expresión de la proteína GAPDH. Se incluyó en el gel 1 µg de proteína 3D recombinante purificada como control de especificidad. A la izquierda se indica la posición de los marcadores de masa molecular (en kDa).

4.4.2. Inmunogenicidad frente al VFA inducida por el rAdV-3D

Se inmunizaron grupos de 10 ratones C57BL/6 con 1×10^9 IFU de los rAdV-3D o rAdV-3D KAKA siguiendo el esquema mostrado (Figura 4.34). Como control, se inmunizaron grupos de animales con rAdV-LacZ y PBS. Al D8 post-boost (pb) se procedió al sacrificio de 5 animales por grupo, de los que se analizó tanto la respuesta humoral como celular. Los 5 animales por grupo restantes se desafiaron con una dosis letal 1×10^3 pfu del VFA serotipo C Santa Pau 58 clon 1 (C S8c1).



4.34. Esquema de la inmunización y desafío de ratones con la rAdV-3D de VFA.

Mediante ensayos ELISA frente a la proteína 3D purificada no se detectaron Acs IgGs específicos en ninguna de las muestras ensayadas. Utilizando ensayos de seroneutralización frente a VFA se descartó también la presencia de AcsN frente a VFA en los animales inmunizados con los rAdV(s) (datos no mostrados). Sin embargo, el ensayo de ELISPOT IFN γ demostró la inducción de una respuesta celular específica frente a la proteína 3D en los animales inoculados con los rAdV-3D que no se detecta en los grupos control (Figura 4.35).

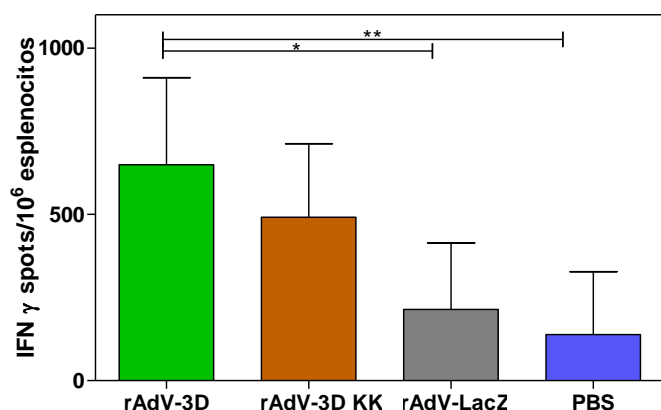


Figura 4.35. Respuesta celular específica inducida por rAdV-3D *in vivo*. Frecuencia de células productoras de IFN γ específicas medida por ELISPOT frente a la proteína 3D de VFA en esplenocitos de ratones inmunizados con rAdV(s) obtenidos al día 7 post-boost. Se indican las media y la desviación estándar del número de células/millón de esplenocitos de los grupos indicados. Las diferencias significativas se muestran como: * ($p<0.05$) y ** ($p<0.01$).

Tras la inoculación del virus, todos los animales murieron entre el día 1 y 2 post infección. Por tanto, en las condiciones ensayadas, se indujo una respuesta celular específica frente a la proteína 3D del VFA que sin embargo no fue capaz de proteger de la mortalidad inducida por la infección con VFA.

4.4.3. Generación y caracterización de VLP quimérica RHDV-VFA que presenta el epítipo B del serotipo C de VFA

Se ha descrito que el serotipo C de VFA capaz de causar letalidad en la cepa de ratones C57BL/6 [231]. En miras de explorar la capacidad del rAdV 3D de contribuir en la protección ante el desafío viral mediada por las VLPs de RHDV-VFA en el modelo murino, se generó en primer lugar un baculovirus recombinante que expresa la VP60 de RHDV con el epítipo B lineal de VFA del serotipo C cepa S8c1. La secuencia descrita que contiene dicho péptido es: TTTYTASARGDLAHLTTTHARHLP (24 aa), y abarca el bucle G-H de la proteína VP1 de VFA (Figura 4.36). La secuencia de este péptido está igualmente flanqueada por los aminoácidos GS e insertado en el sitio L de la VP60 ya descrito.

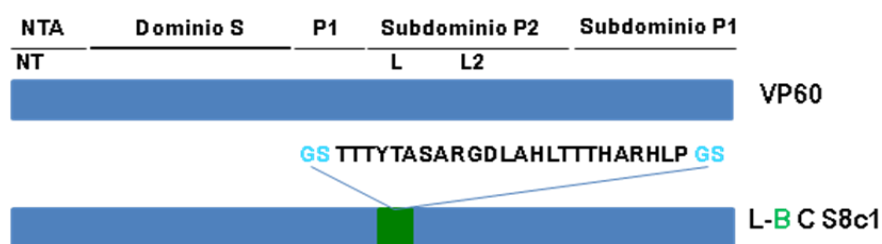


Figura 4.36. Representación esquemática de la VLP quimérica RHDV-VFA L-B S8c1. A la derecha se muestra el nombre de la construcción. La barra horizontal de color celeste representa la proteína VP60 de RHDV y sobre ella los sitios de inserción de secuencias heterólogas: NT, L y L2. La barra verde representa el péptido incorporado en L. Se indican los dominios estructurales principales de la proteína VP60.

La proteína recombinante se purificó siguiendo el protocolo de obtención de VLPs de RHDV establecido previamente y se utilizó para hacer ensayos de SDS-PAGE, ELISA y WB. La expresión de la proteína recombinante purificada exhibió una movilidad electroforética de acuerdo con el tamaño esperado y un

nivel de pureza equiparable al obtenido con otras construcciones (Figura 4.37 A). Mediante WB, se evidencia que todas las construcciones son mutantes de la proteína VP60 (Figura 4.37 B) y que la construcción L-B CS8c1 incorpora en concreto el epítipo B del serotipo C (Figura 4.37 C).

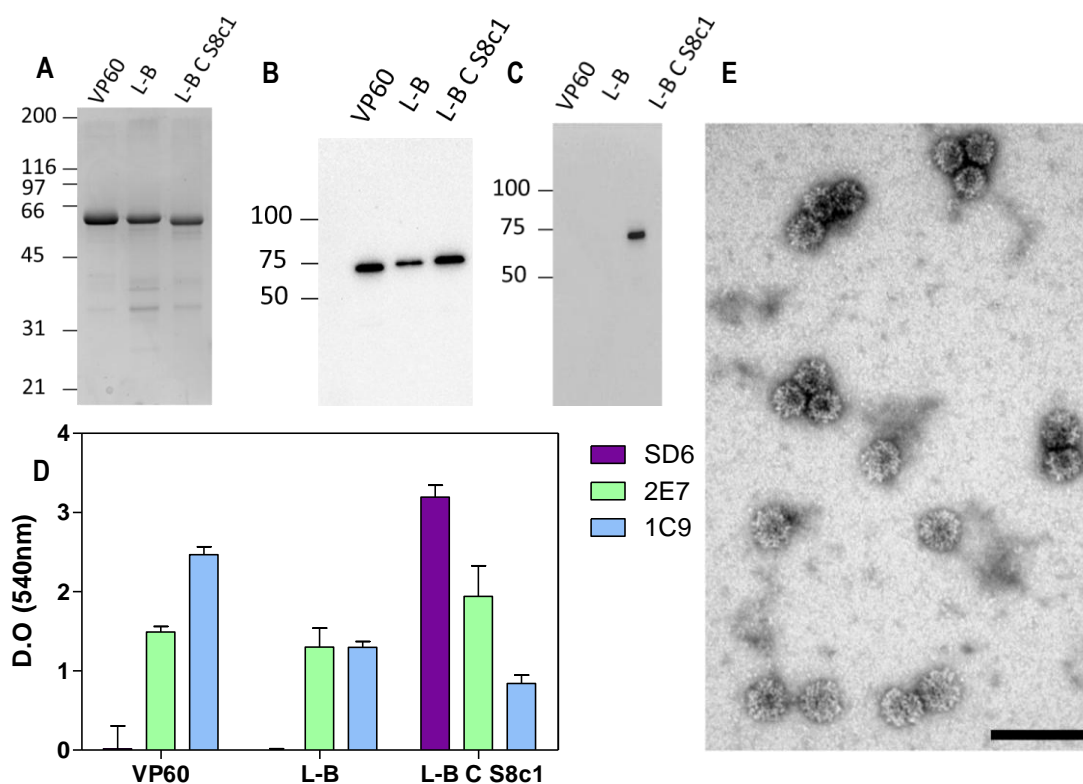


Figura 4.37. Análisis de la VLP quimérica RHDV-VFA L-B S8c1 purificado. (A) Análisis por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. (B) WB de las mismas muestras empleando el mAb 2E7 y (C) WB con el mAb SD6. (D) ELISA tapizando con la VLP L-B C S8c1, señal dada ante los Acs mAb SD6, específico al epítipo B de serotipo C de VFA, 2E7, que reconoce la proteína VP60 de RHDV y 1C9 que reconoce el bucle 1 (L) de VP60. La proteína VP60 y la construcción L-B (que incorpora el péptido B de O UK) se muestran en paralelo. (E) Análisis por microscopía electrónica del mutante de inserción que incorpora el epítipo B C S8c1 de VFA. Se muestra el análisis por tinción negativa de preparación purificada de la VLP quimérica indicada.

Se realizó también un ELISA para comprobar la correcta inserción del epítipo en el bucle L de la proteína VP60. Para ello, se tapizaron placas con la VLP L-B C S8c1 (además la VLP parental y la construcción L-B como controles), utilizando como Acs primarios, el anticuerpo monoclonal (mAb) SD6 (descrito en [224], reconoce el bucle G-H de la VP1 de VFA serotipo C), mAb 2E7 (Comunicación personal), que reconoce la proteína VP60) y mAb 1C9 (Comunicación personal), que reconoce la secuencia original del bucle L de VP60). Como se puede apreciar en la Figura 4.37 D, y al igual que en el WB, se detectó señal específica del mAb SD6 sólo con la construcción L-B C S8c1. En todas las construcciones se reconoce la proteína VP60 (señal con mAb 2E7), indicando la presencia de la proteína VP60. Adicionalmente, la señal detectada con el mAb 1C9 se reduce con las construcciones L-B y L-B C S8c1, indicando cambio en la secuencia del bucle L, demostrando así la incorporación de los epítopos foráneos en este sitio de

inserción concreto. A continuación, para determinar si la nueva construcción química conserva la capacidad de auto-ensamblaje en forma espontánea, para formar VLPs, se analizó la proteína purificada por tinción negativa al microscopio electrónico. A pesar de una marcada tendencia de esta construcción a agregarse, evidenciada por la aparición de un gran número de precipitados sombreados en las muestras (no mostrado), fuimos capaces de detectar la presencia de un número de VLPs con un diámetro aproximado de 40 nm, morfológicamente similares a las VLPs formadas por VP60 al disociar la muestra mediante sonicación extensiva (Figura 4.37 E).

4.4.4. Inmunogenicidad y protección frente VFA conferidas por una estrategia de inmunización prime-boost con AdV-3D y VLP química RHDV-VFA: L-B C S8c1

La respuesta inmune inducida por la combinación prime-boost heterólogo de rAdV-3D y VLP química, L-B C S8c1, se evaluó en el modelo murino. Para ello, se inmunizaron grupos de 10 ratones de la cepa C57BL/6 por vía SC dos veces (con un intervalo de 21 días) con 100 µg de la VLP emulsionada con Montanide 50V2. Seguidamente, 7 días post-boost (dpb) se inmunizaron vía SC con 1×10^9 IFU de rAdV-3D. En paralelo se incluyó un grupo inmunizado utilizando una estrategia alternativa (primero el rAdV-3D y 8dp inmunización se administró la VLP, con boost 20 días después de la primera dosis de VLP). Como controles se tomaron en cuenta los siguientes grupos de ratones: inmunizados con L-B C S8c1 más rAdV-LacZ (adenovirus recombinante diseñado como control negativo); inmunizados con VLP química L-B (que lleva el epítipo B de O UK) más rAdV-LacZ y un grupo inoculado con PBS-V. Siete días después de inmunización con rAdV-3D o la segunda inmunización con la VLP respectivamente, se sacrificaron 5 ratones por grupo y se tomaron muestras para la evaluación de la respuesta humoral y celular. Los ratones restantes de cada grupo fueron desafiados con 3×10^2 TCID₅₀ de VFA serotipo C cepa S8c1 (Figura 4.38).

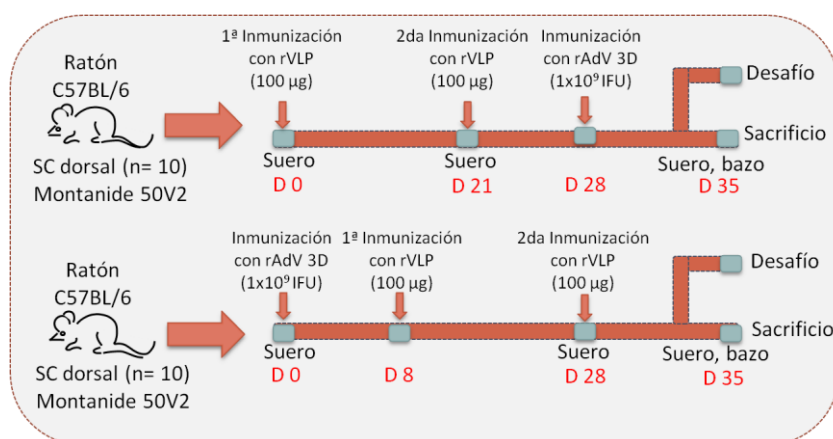


Figura 4.38. Esquema de la inmunización con sistema prime boost heterólogo utilizando VLP química RHDV-VFA más rAdV-3D y desafío viral en ratones

4.4.4.1. Análisis de la respuesta humoral

Los sueros obtenidos se analizaron por ELISA para detectar Acs (IgGs) frente a la proteína VP60 (empleando VLPs de RHDV como antígeno) y frente al epítipo B del VFA (empleando un péptido sintético con la secuencia del epítipo B de C S8c1). Todos los sueros pre-inmunes y de los ratones del

grupo control negativo (PBS-V) resultaron negativos para IgGs frente a los dos antígenos analizados (datos no mostrados). Sin embargo, todos los ratones inmunizados con VLPs derivadas de RHDV, desarrollaron títulos altos y similares entre sí de Acs anti-VP60 (Figura 4.39 A).

Los sueros obtenidos a días 21 y 35, antes y después de la primera inmunización respectivamente, fueron analizados. Todos los ratones inmunizados con las VLPs quiméricas que incorporan el epítipo B C S8c1 del VFA, desarrollaron títulos elevados de Acs específicos frente al péptido B (Figura 4.39 B y C). Los títulos alcanzados antes y después del boost son equiparables entre grupos, no evidenciándose diferencias significativas entre los mismos. Los sueros de los ratones inmunizados con la construcción L-B OUK resultaron negativos para la generación de Acs anti B C S8c1 (datos no mostrados).

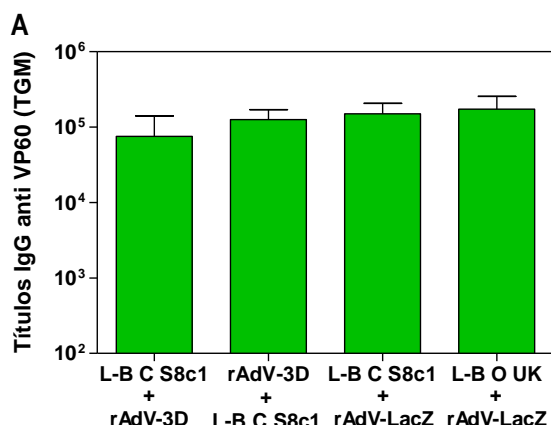
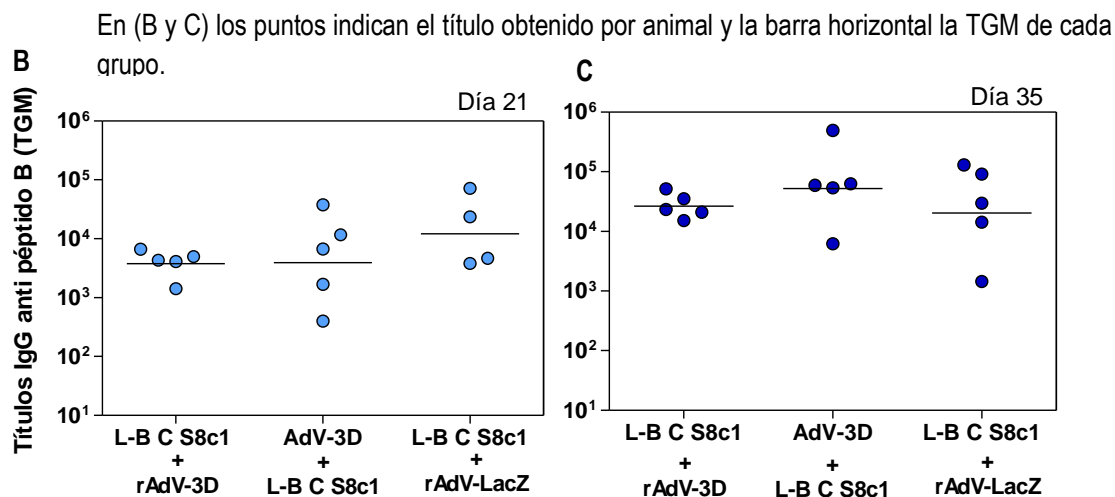


Figura 4.39. Respuesta humoral inducida por VLP quimérica RHDV-VFA L-B C S8c1 en ratón. Los sueros de los grupos de ratones inmunizados se analizaron por ELISA para determinar los títulos de Acs IgGs frente a la proteína VP60 (A) y al epítipo B C S8c1, antes (B) y después del boost (C). En (A) se presentan los TGMs de los sueros tomados al día 35 post inmunización de cada grupo de ratones y las barras de error indican la desviación estándar.



Se analizó también la distribución de isotipos (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgA) (Figura 4.40). Los resultados muestran que en todos los grupos evaluados, las subclases de IgG1 e IgG2b son mayores en comparación con la de IgG2a e IgA, sin diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la distribución de isotipos.

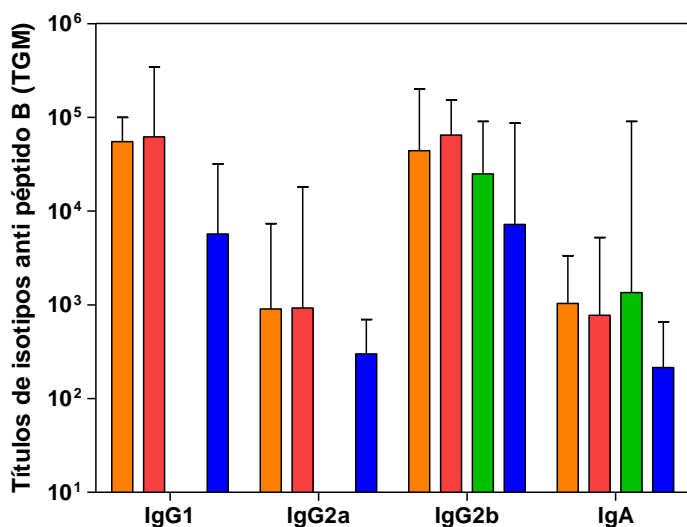


Figura 4.40. Títulos de isotipos de Acs específicos. Los sueros post-boost (D35 post inmunización) de los grupos de ratones indicados se analizaron por ELISA para determinar los títulos de las subclases de isotipos de los Acs IgGs frente al epítipo B de VFA. Se representan las medias y la desviación estándar de cada grupo de ratones identificados por colores: L-B C S8c1 + rAdV-3D (naranja), rAdV-3D + L-B C S8c1 (rojo), L-B C S8c1 + rAdV-LacZ (verde) y L-B O UK + rAdV-LacZ (azul).

Se analizó la presencia y magnitud de la actividad neutralizante frente a la infección de células BHK por el VFA en los sueros de los ratones inmunizados. Los sueros del grupo control negativo (PBS-V), al igual que el grupo inmunizado con la VLP L-B O UK, no mostraron actividad neutralizante frente al VFA serotipo C (datos no mostrados). Todos los sueros de ratones inmunizados con VLP quimérica L-B C S8c1 mostraron actividad neutralizante frente al VFA homólogo (Figura 4.41) no evidenciándose diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

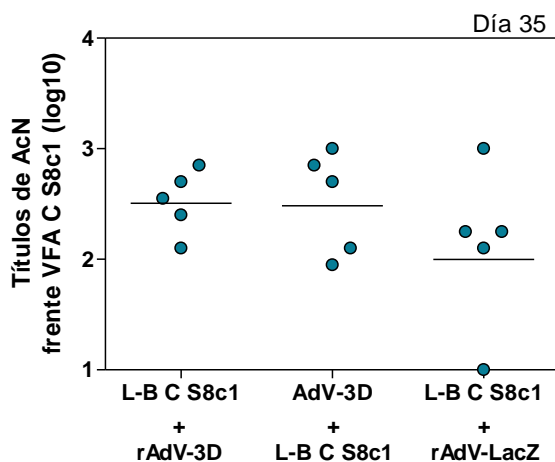


Figura 4.41. Actividad neutralizante frente al VFA inducida por VLP quimérica RHDV-VFA L-B C S8c1. El título de AcsN determinado para cada animal se expresó como el logaritmo en base 10 (log10) del valor recíproco de la mayor dilución ensayada capaz de neutralizar 100TCID₅₀ del virus homólogo. La línea horizontal representa la media del grupo.

4.4.4.2. Análisis de la respuesta celular

Para detectar células secretoras de IFN γ específicas al estímulo la proteína no estructural 3D de VFA expresado por el rAdV-3D, se realizó un ensayo de ELISPOT IFN γ . Todos los ratones inmunizados con el rAdV-3D fueron capaces de inducir una activación de células secretoras de IFN γ potente frente al estímulo específico de la proteína 3D (Figura 4.42) Las diferencias encontradas entre los grupos inmunizados en presencia de rAdV-3D con los grupos control son estadísticamente significativas.

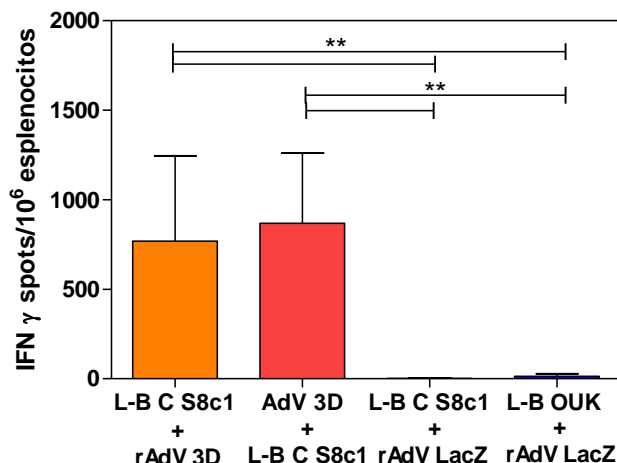


Figura 4.42. Respuesta celular específica inducida durante la vacunación rAdV-3D más VLP RHDV-VFA en ratones. El número de células secretoras de IFN γ específicas al estímulo de la proteína 3D en esplenocitos de ratón de los grupos indicados se determinó mediante ensayo ELISPOT. Se indican diferencias estadísticamente significativas como: ** ($p < 0.05$).

4.4.4.3. Análisis post desafío viral

Tras la inoculación con VFA, todos los animales inmunizados con L-B C S8c1 sobrevivieron a la infección viral, independientemente de la presencia de AdV-3D o AdV-lacZ, mientras que más de la mitad (3/5) de los animales murieron entre el día 2 y el día 7 post infección en los grupos control L-B OUK + rAdV-LacZ y PBS. Este resultado indica que la inmunización con la VLP portadora del epítipo derivado del serotipo C es capaz de inducir un grado de protección frente al desafío con el virus homólogo, aunque las condiciones del ensayo no permiten determinar el efecto sobre la protección de la vacunación combinada con el rAdV-3D. Para esto será necesario incrementar la dosis del virus utilizada para el desafío.

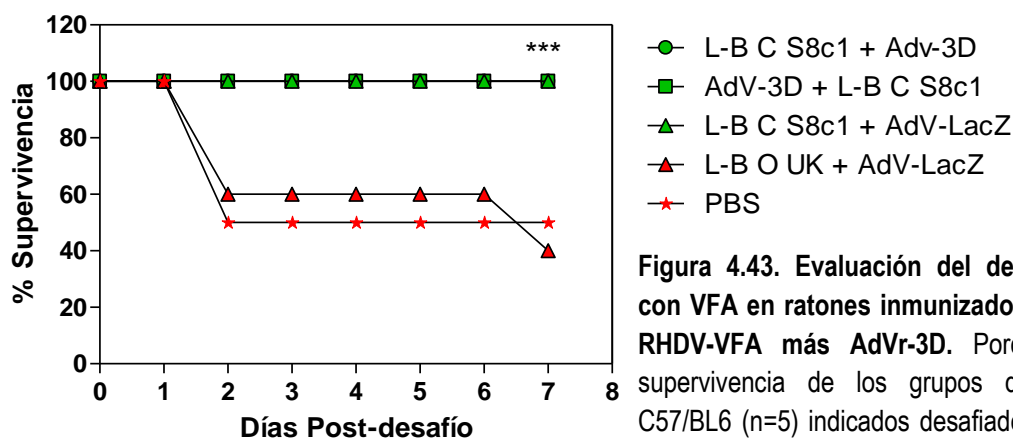


Figura 4.43. Evaluación del desafío viral con VFA en ratones inmunizados con VLP RHDV-VFA más Advr-3D. Porcentaje de supervivencia de los grupos de ratones C57/BL6 ($n=5$) indicados desafiados con una 3×10^2 pfu del VFA serotipo C S8c1.

Se indican diferencias estadísticamente significativas como: *** ($p < 0.05$) entre los grupos inmunizados con VLP L-B C S8c1 (verde) y los grupos controles (rojo).

4.5. Diseño de VLPs quiméricas de RHDV multivalentes, presentadoras de epítomos heterólogos del VFA

Trabajos previos de nuestro laboratorio orientados a la identificación de regiones lineales inmunodominantes presentes la secuencia del subdominio P2 de la proteína VP60, localizaron otra región expuesta en la proteína de la cápsida de RHDV, como zona candidata para aceptar la inserción de epítomos foráneos, denominada región R2. La región R2 corresponde a los aa en las posiciones 330 a 345, forma parte del bucle L2 del subdominio P2 y se localiza en la zona más conservada entre los lagovirus dentro de este subdominio.

4.5.1. Generación y caracterización de VLPs quiméricas de RHDV-VFA que presentan epítomos B de VFA en los bucles 1 y 2 de la proteína VP60

Con el objetivo de estudiar la utilización del bucle L2 como candidato para aceptar epítomos heterólogos para su presentación, utilizamos como modelo el péptido B lineal de la cepa O UKG/01 de VFA, para la generación de una nueva VLP quimérica RHDV-VFA que lleva este epítopo en el sitio de inserción L2. La construcción fue denominada L2-B y la hemos comparado con la construcción homóloga que lleva el mismo epítopo insertado en el bucle L, descrita en experimentos anteriores como L-B (Figura 4.44).

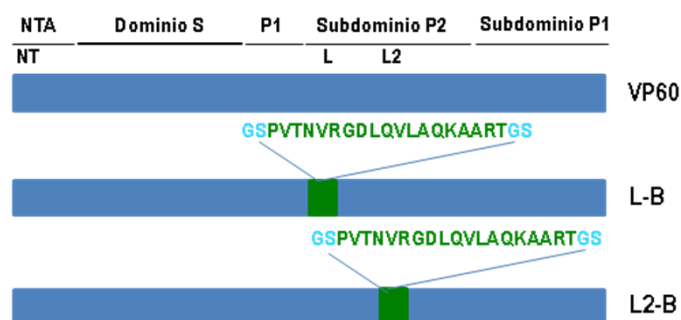


Figura 4.44. Representación esquemática de los mutantes de inserción de la proteína VP60 que incorporan el epítopo B de O UK en L o L2. A la derecha se muestran los nombres de las construcciones. La barra horizontal de color celeste representa la proteína VP60 de RHDV y sobre ella los sitios de inserción de secuencias heterólogas: NT, L y L2. Las barras verdes representan los péptidos B de O UK. Se indican los dominios estructurales principales de la proteína VP60.

Las proteínas recombinantes purificadas se obtuvieron como se ha descrito en anteriores apartados y se analizaron mediante SDS-PAGE (Figura 4.45 A), mostrando movibilidades electroforéticas de acuerdo con las esperadas (aprox. 60 kDa) y una elevado grado de pureza. El análisis por microscopía electrónica mediante tinción negativa (Figura 4.45 B) reveló que las proteínas quiméricas L2-B es capaz de formar VLPs con un diámetro aproximado de 40 nm, morfológicamente similares a las VLPs formadas por la proteína nativa VP60.

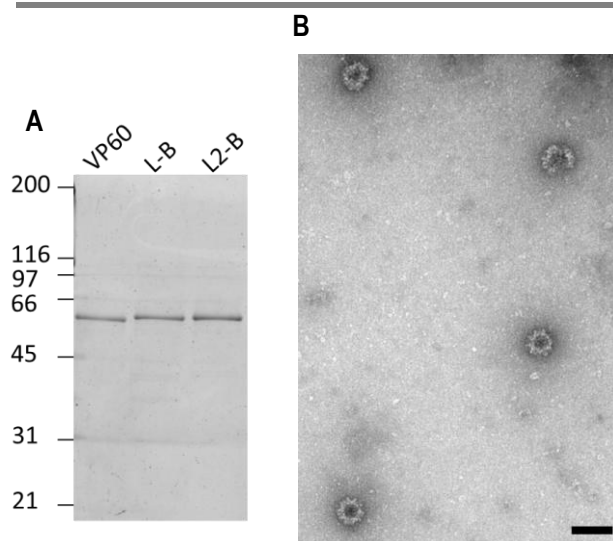


Figura 4.45. Análisis de los mutantes de inserción de la proteína VP60 que incorporan los epítomos B de serotipos O en Loop 1(L) y Loop 2 (L2). (A) Las proteínas purificadas correspondientes se analizaron por SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. A la izquierda se indica la posición de los marcadores de masa molecular. La proteína VP60 parental se llevó en paralelo en todos los análisis. (B) Análisis por microscopía electrónica de los mutantes de inserción que incorpora el epítomo B de O UK VFA en L2. Se muestra el análisis por tinción negativa de preparaciones purificadas de las proteínas recombinantes indicadas. La escala de la barra

4.5.2. Inmunogenicidad inducida en ratón por VLPs quiméricas RHDV-VFA que presentan el epítomo B de VFA en L o L2

Se inmunizaron 5 ratones C57BL/6 por grupo con 100 μ g de las VLPs quiméricas RHDV-VFA L-B y L2-B y como control con la VLP parental (VP60) siguiendo el esquema de la figura 4.46.

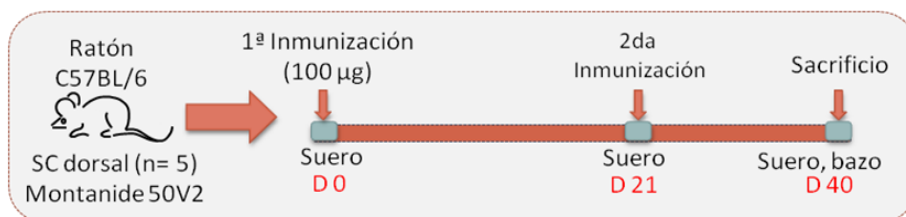


Figura 4.46. Esquema de la inmunización de ratones con las VLPs quiméricas RHDV-VFA

Ambas VLPs indujeron la generación de Acs con títulos elevados frente a la proteína VP60. (Figura 4.47 A). Además, la VLP que expone el epítomo B en el nuevo sitio de inserción fue capaz de inducir títulos elevados de Acs específicos frente al péptido B y al VFA, en una magnitud equiparable a la obtenida con la VLP quimérica ya caracterizada (Figura 5.47 B y C). En ambos casos, los títulos de Acs aumentaron tras el boost.

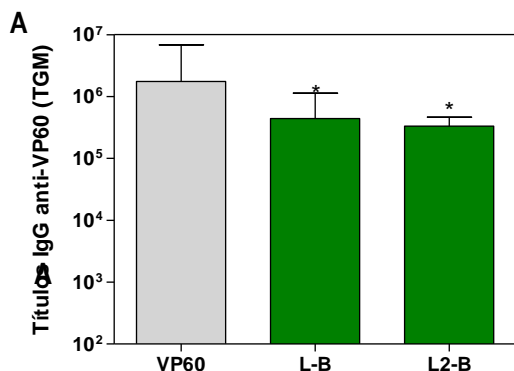
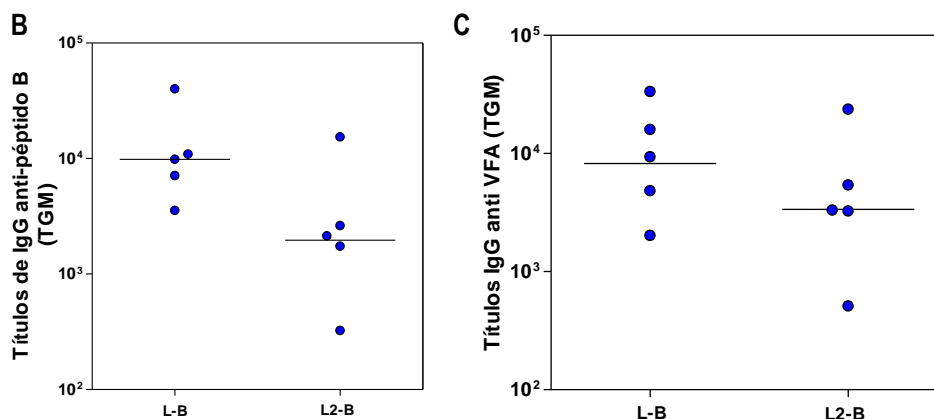


Figura 4.47. Respuesta humoral inducida por VLPs RHDV-VFA en ratones. Los sueros de los grupos de ratones inmunizados se analizaron por ELISA para determinar los títulos de Acs IgGs frente a la proteína VP60 (A), al péptido B (B) y al VFA (C) de sueros tomados al día 40 post inmunización. En (A) las barras representan la TGM con un intervalo de confianza del 95% de cada grupo de ratones y las barras de error indican la TGM de cada grupo.

En (B y C) se presentan los títulos de Acs de cada individuo por grupo y las barras indican la TGM de cada grupo.



Los sueros del grupo control negativo (VP60) no mostraron actividad neutralizante (datos no mostrados), mientras que los dos grupos inmunizados con las construcciones L-B y L2-B fueron capaces de inducir la producción de AcsN para VFA con títulos similares entre sí (Figura 4.48).

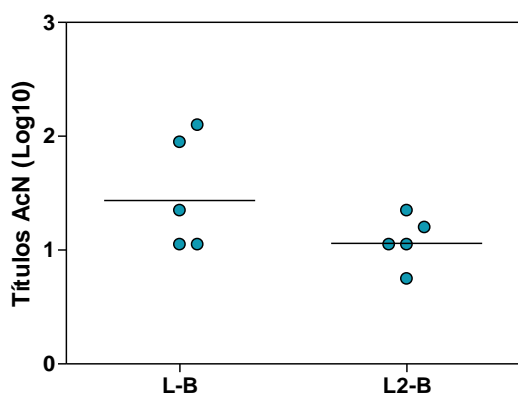


Figura 4.48. Actividad neutralizante frente al VFA inducida por las VLPs RHDV-VFA. El título de AcsN determinado para cada animal se expresó como el logaritmo en base 10 (\log_{10}) del valor recíproco de la mayor dilución ensayada capaz de neutralizar 100TCID₅₀ del virus homólogo. La línea horizontal representa la media del grupo.

Tanto el sitio de inserción L como L2 son funcionales para la presentación del epítipo B de VFA

4.5.3. Generación y caracterización de VLPs quiméricas de RHDV-VFA que presentan simultáneamente epítipos B de los serotipos O y A de VFA

Seguidamente, para explorar la posibilidad de adaptar la utilización de VLPs RHDV-VFA a la inducción de respuestas neutralizantes bivalentes, se generó un rBV que incorpora los epítipos B derivados de dos serotipos relevantes. Se seleccionaron los epítipos B lineales de dos cepas de los serotipos O y A, al ser éstos los más frecuentes a nivel mundial. La secuencia de aminoácidos del péptido B de O UK es PVTNVRGDLQVLAQKAART (19aa) y la secuencia del péptido B de A22 IRQGTGRRGDLGPLAARVAAQLP (20aa), ambos correspondientes con el bucle G-H de la proteína VP1 de VFA. Las secuencias heterólogas fueron insertadas en la proteína VP60 de RHDV flanqueadas por los aminoácidos GS, tal como se muestra en el esquema (Figura 4.49).

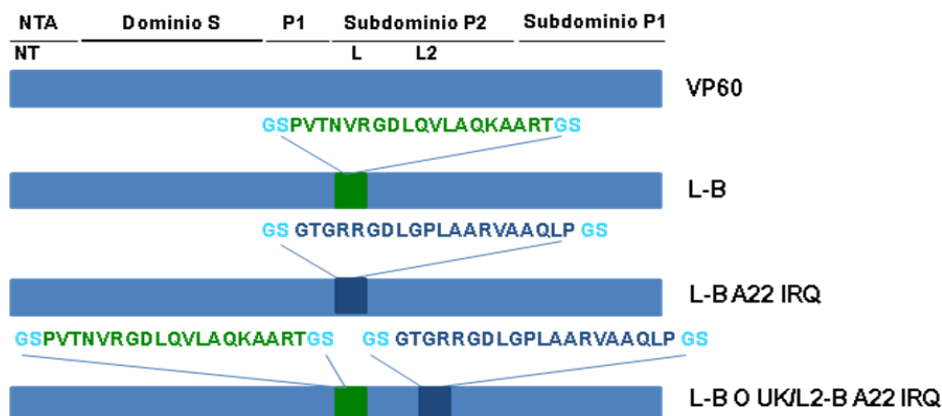


Figura 4.49. Representación esquemática de los mutantes de inserción de la proteína VP60 que incorporan epítomos B de los serotipo O y A de VFA. A la derecha se muestran los nombres de las construcciones. La barra horizontal de color celeste representa la proteína VP60 de RHDV y sobre ella los sitios de inserción de secuencias heterólogas: NT, L y L2. Las barras verde y azul representan los péptidos B de O UK y A22 IRQ respectivamente. Se indican los dominios estructurales principales de la proteína VP60.

Las proteínas recombinantes se expresaron y purificaron como en los casos anteriores (Figura 4.50) y las bandas correspondientes exhibieron movilidades electroforéticas de acuerdo al tamaño de las secuencias incorporadas en cada construcción (aprox. 60 kDa).

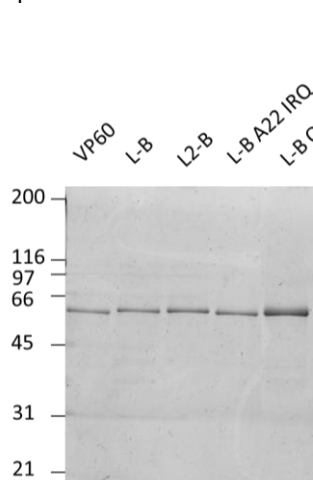


Figura 4.50. Análisis de los mutantes de inserción de la proteína VP60 que incorporan epítomos B de los serotipos O y A de VFA. Las proteínas purificadas correspondientes se analizaron por SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. A la izquierda se indica la posición de los marcadores de peso molecular. La proteína VP60 parental se llevó en paralelo en todos los análisis.

4.5.4. Inmunogenicidad multivalente inducida en ratón por las VLPs quiméricas RHDV-VFA

La respuesta inmune inducida por la VLP quimérica con doble inserción: L-B O UK/L2-B A22 IRQ, se evaluó en el modelo murino. Para ello, se inmunizaron grupos de 5 ratones de la cepa C57BL/6 por vía SC dos veces (con un intervalo de 21 días) con 100 µg de la VLPs emulsionadas con Montanide 50V2. En paralelo se incluyeron grupos inmunizados con las construcciones que insertan los mismos epítomos de manera individual: L-B O UK y L-B A22 IRQ. Además de un grupo control negativo inoculado con PBS-V. Quince días después de la segunda inmunización con la VLP, se tomaron muestras de suero para la evaluación de la respuesta humoral (Figura 4.51).

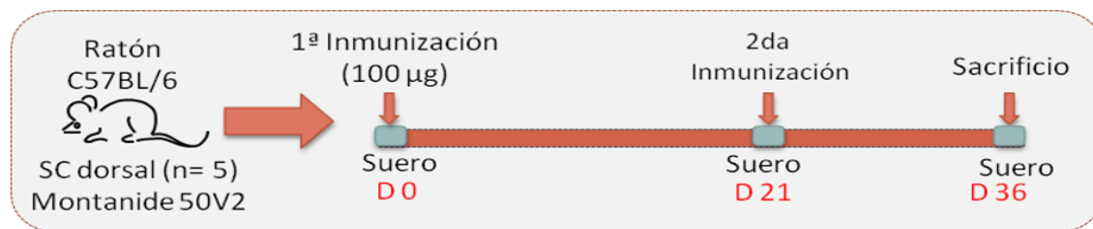


Figura 4.51. Esquema de la inmunización con las VLPs quimérica RHDV-VFA que presentan epítopos B heterólogos

Los sueros obtenidos se analizaron por ELISA para detectar Acs (IgGs) frente a la proteína VP60 (empleando VLPs de RHDV como antígeno) y frente al epítipo B del VFA (empleando un péptido sintético con la secuencia del epítipo B lineal correspondiente al serotipo O UK y A22 IRQ respectivamente). Todos los sueros pre-inmunes resultaron negativos para IgGs frente a los dos antígenos analizados (datos no mostrados).

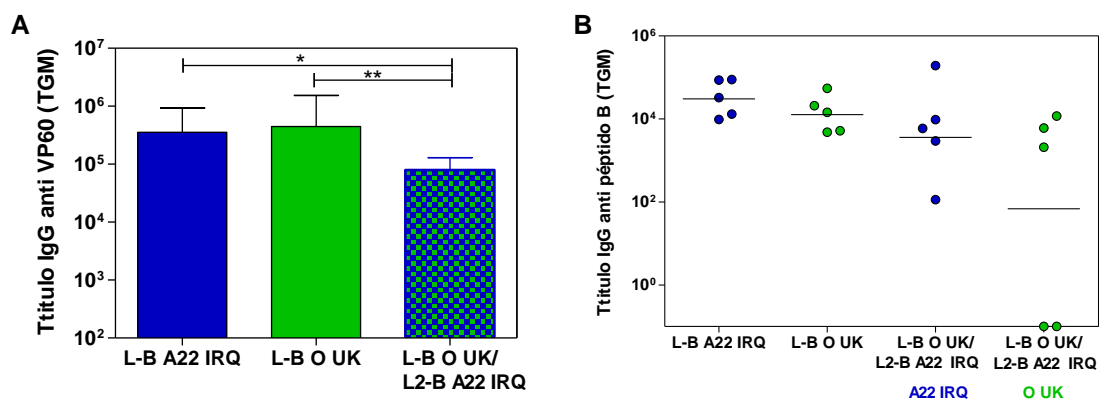


Figura 4.52. Respuesta humoral de VLPs quiméricas RHDV-VFA que presentan epítopos B heterólogos. Los sueros de los ratones inmunizados se analizaron por ELISA para determinar los títulos de Acs IgGs frente a la proteína VP60 (A) y al epítipo B de VFA correspondiente. En (A y B) los puntos indican el TGMs obtenido por animal y la barra horizontal la media de cada grupo de los sueros tomados al día 36 post inmunización. Los colores azul (A22 IRQ) y verde (OUK) indican al antígeno frente al cual se generan dichos títulos.

Los sueros obtenidos a días 21 y 36 tras la primera inmunización de los ratones del grupo control negativo (PBS-V) también fueron negativos frente a ambos antígenos (datos no mostrados). Todos los ratones inmunizados con VLPs derivadas de RHDV, desarrollaron títulos altos de Acs anti-VP60. Sin embargo, el grupo inmunizado con la construcción que lleva la doble inserción, los títulos fueron significativamente más bajos con respecto a los grupos que llevan los mismos epítopos de manera independiente (Figura 4.52 A).

Todos los ratones inmunizados con las VLPs quiméricas que incorporan el epítipo B de OUK o A22 IRQ del VFA por separado, desarrollaron títulos elevados de Acs específicos frente a su epítipo B correspondiente (Figura 4.52 B). En el grupo de animales inmunizados con la construcción de doble inserción, todos los animales generaron títulos frente al péptido B de A22 IRQ y 3/5 también lo hicieron

frente al epítipo B de OUK. Se analizó la presencia y magnitud de la actividad neutralizante frente a la infección de células IBRS y BHK por los virus del serotipo O UK y A22 IRQ respectivamente, en los sueros de los ratones inmunizados con las distintas VLPs quiméricas. Los sueros del grupo control negativo (PBS-V) no mostraron actividad neutralizante (datos no mostrados). Todos los sueros de ratones inmunizados con VLPs quiméricas incorporando el epítipo B de A22 IRQ mostraron actividad neutralizante frente al VFA homólogo, incluyendo los 5 ratones del grupo inmunizado con la construcción doble. En este último grupo, la respuesta neutralizante frente al serotipo O UK se consiguió en 3/5 animales, que corresponden a los que habían desarrollado Acs específicos frente al péptido correspondiente. (Figura 4.53).

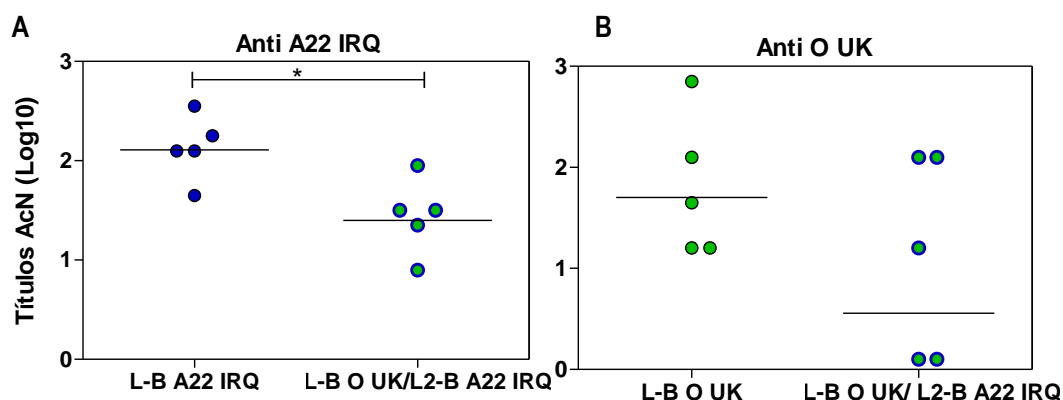


Figura 4.53. Actividad neutralizante frente al VFA inducida por VLPs quiméricas RHDV-VFA que presentan epítipos B heterólogos. El título de AcsN determinado para cada animal se expresó como el logaritmo en base 10 (\log_{10}) del valor recíproco de la mayor dilución ensayada capaz de neutralizar 100TCID₅₀ de los virus A22 IRQ (A) y O UKG/01 (B). La línea horizontal representa la TGM del grupo. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como: * ($p < 0.05$).

Capítulo 5

Discusión



5.1. Desarrollo de nuevas estrategias de vacunación frente al virus de la fiebre aftosa basadas en pseudopartículas virales de RHDV

La enfermedad de Fiebre Aftosa (FA) sigue siendo al día de hoy una de las enfermedades animales más importantes en todo el mundo. Se encuentra distribuida de forma endémica por amplias regiones de África, Asia, Oriente Medio y Sudamérica, lo que supone una importante amenaza al sistema productivo de la Unión Europea (UE), dada la proximidad de algunas de estas zonas y por las relaciones comerciales establecidas con ellas. Aunque causa bajas tasas de mortalidad, su morbilidad es muy elevada debido a su alta transmisibilidad, además afecta a un elevado número de especies ganaderas, por lo que la aparición de brotes de FA en países libres causa un grave impacto económico. Se ha estimado que las mermas económicas ascienden a entre 5.7 y 18.6 mil millones de euros anuales, en los países con FA endémica, basado solo en pérdidas en la producción y vacunación [105]. En consecuencia, la FA es una de enfermedades de declaración obligatoria en la UE y en la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Siendo la vacunación y la exploración de nuevas estrategias vacunales, uno de los puntos más relevantes que continúan en estudio.

Actualmente la vacuna convencional basada en virus inactivado, desempeña un papel importante en el control de la enfermedad en zonas endémicas. Sin embargo, esta vacunación está prohibida en la UE y solo se contempla su uso en una situación epidemiológica de emergencia. El último brote de FA en la UE se produjo en 2007 en Reino Unido, originado por un escape viral en la planta de fabricación de vacunas [177], poniendo de manifiesto el riesgo de manejar grandes cantidades de virus infeccioso, a pesar de aplicar estrictas medidas de bioseguridad. Con anterioridad a ese brote, en 2001 se declaró una epidemia de FA en el Reino Unido, Irlanda, Francia y Holanda [115]. En esa ocasión, el control de la enfermedad se basó en la restricción del movimiento de animales, la vacunación de urgencia y el inmediato sacrificio de las poblaciones de animales afectados y en riesgo [232, 233]. Esta estrategia de control tuvo como objetivo reducir al máximo la excreción de virus al medio ambiente y garantizar el adecuado seguimiento epidemiológico. Sin embargo, tuvo graves repercusiones sociales, medioambientales y económicas [118], además se vio principalmente limitada debido a la inmunidad no esterilizante mediada por la vacuna, que favorece los estados portadores [114, 234] y a las dificultades para diferenciar entre animales vacunados e infectados, producto de purificaciones ineficientes de la vacuna convencional de VFA [114, 170]. Por tanto son evidentes las limitaciones de las vacunas convencionales actualmente disponibles para el control de VFA, quedando patente la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de vacunación. En esta tesis doctoral, se persigue contribuir al desarrollo de vacunas de nueva generación para VFA, DIVA, eficaces, seguras y estables.

Las VLPs son ensamblados supramoleculares que mimetizan la estructura de las partículas víricas, pero que carecen de genoma viral lo que las hace extremadamente seguras [24, 27, 30, 235]. Actualmente, el desarrollo de estrategias de vacunación basadas en VLPs constituye uno de los abordajes más

prometedores, debido a sus propiedades inmunogénicas inherentes, derivadas de su estructura altamente organizada, repetitiva y similar en tamaño y morfología a los virus [12, 18, 236]. De hecho, existen disponibles en el mercado vacunas basadas en VLPs para enfermedades animales y humanas, además de muchas otras en fases avanzadas de ensayos clínicos [13, 32, 78, 237]. En esta tesis doctoral utilizamos las VLPs de RHDV, las cuales han demostrado: 1) Fácil producción y con elevado rendimiento [76, 88], 2) Ser altamente inmunogénicas [13, 24], 3) Aplicabilidad como reactivos de diagnóstico y vacunas para el control de la enfermedad hemorrágica del conejo en poblaciones susceptibles [20, 87], 4) Versatilidad al ofrecer la posibilidad de incorporar secuencias heterólogas relativamente largas (~ 60 aa), en al menos tres localizaciones diferentes [64]. Gracias a esta última característica, han sido objeto de estudio para inducir inmunidad protectora heteróloga, al funcionalizarlas como plataforma para la presentación de epítomos de células T [63, 89], células B [64] y tumorales [62, 66-69] derivadas de otros virus. Estudios con VLPs de otros virus se han reportado como sistema de presentación de epítomos de VFA. A manera de ejemplo podemos mencionar: derivadas de virus de plantas como del virus del mosaico del caupí (CPMV), timovirus moteado del phylaxis (PhMV), virus del mosaico del bambú (BaMV) y del virus del mosaico del tabaco (TMV) [238-242], derivadas de virus animales como el virus de la bursitis infecciosa, virus de la hepatitis B, parvovirus porcino y bovino [243-246] y bacteriófagos como MS2, T4 y T7 [36, 37, 247, 248]. Con estos antecedentes y la amplia descripción de los sitios antigénicos B y T relevantes del VFA, abordamos como primer objetivo de esta tesis, el desarrollo de VLPs quiméricas de RHDV presentadoras de epítomos de VFA y su evaluación como vacuna frente a FA.

5.2 VLPs quiméricas de RHDV que presentan epítomos de VFA inducen respuesta humoral específica y potente frente a FA y confieren protección parcial tras el desafío viral

En esta tesis por primera vez se diseñan y obtienen VLPs quiméricas de RHDV capaces de inducir respuesta inmune humoral específica frente a epítomos del VFA. Para ello seleccionamos un epítomo B, denominado bucle G-H, que corresponde con la secuencia del sitio antigénico neutralizante 1 (SN1), entre las posiciones 140-158 de la proteína VP1 de VFA O-UKG/01 [217]. Como epítomo T, se insertó la secuencia 21-35 de la proteína no estructural 3A, identificada previamente en nuestro laboratorio como un epítomo T inmunodominante en cerdo, heterotípico (conservado entre serotipos) y promiscuo (ampliamente reconocido en el contexto de alelos del SLA de clase II frecuentemente representados en las poblaciones naturales de cerdos Landrace x Large White) [148].

Es imposible determinar *a priori* si una secuencia peptídica inmunodominante se comportará de la misma manera en el contexto de una VLP recombinante puesto que la inmunidad intrínseca de la VLP podría enmascarar la respuesta inmune específica frente a ésta. Por otra parte, la incorporación de epítomos heterólogos podría también afectar la capacidad de auto-ensamblaje de la VLP. Por lo tanto, decidimos generar una colección de VLPs recombinantes que incorporaran los epítomos B y T del VFA en tándem o separados, insertos en dos localizaciones de la proteína VP60: 1.) el bucle L del subdominio estructural

P2, altamente expuesto en la VLP, indicado para epítomos B [64] y 2.) El extremo N-T, localizado en el interior de la VLP y adecuado para la inserción de epítomos T [89]. Dado el número de construcciones generadas y atendiendo a consideraciones de bienestar animal y regla de las 3Rs, la inmunogenicidad de esta colección de VLPs quiméricas se evaluó en el modelo murino.

Todas las proteínas VP60 recombinantes generadas en esta primera instancia se obtuvieron en cantidades y grados de pureza comparable y, de manera relevante, fueron capaces de auto-ensamblarse y formar VLPs sin modificaciones aparentes en su morfología (Figura 4.2). Este resultado confirma y expande la versatilidad previamente mencionada de las VLPs de RHDV, como presentadoras de epítomos foráneos. En correlación con resultados previos de nuestro grupo generando VLPs quiméricas presentadoras de un epítomo B neutralizante del calicivirus felino [64], todas las construcciones aquí generadas indujeron títulos altos de Acs específicos frente al epítomo B del VFA (Figuras 4.4; 4.6). Con respecto a la presentación de los epítomos B y T de VFA juntos o separados, si bien es cierto que la magnitud y dispersión de la respuesta difiere entre los grupos, nuestros resultados demuestran que todas las VLPs quiméricas RHDV-VFA evaluadas fueron capaces de presentar el epítomo B de tal manera que indujeran la producción de Acs específicos independientemente de su presentación conjunta (BT) o separada (B/T) y del sitio de inserción evaluado (bucle L o N-T). Aunque sin diferencias estadísticamente significativas, las VLPs que presentan el epítomo B del VFA en el bucle L de forma individual (no en tándem con el epítomo T), indujeron títulos de Acs ligeramente superiores al resto de las construcciones (Figuras 4.4; 4.6). Este resultado confirma la idoneidad de esta posición para la inserción de epítomos B. Hay varios factores que podrían contribuir a la mayor utilidad de esta posición para la incorporación de epítomos B. Por una parte, su mejor accesibilidad al sistema inmune para su reconocimiento por parte de los linfocitos B (capaces de reconocer el antígeno en su forma nativa, sin necesidad de procesamiento) [131], en comparación con la inserción en el extremo N-T, donde los epítomos en las partículas intactas no están expuestos. Y por otra parte, las posiciones 306-307, correspondientes al bucle L tienen un papel relevante en la definición de la antigenicidad e inmunogenicidad de la cápsida de RHDV [249, 250] puesto que es una región implicada en las interacciones virus-huésped y que estimula la producción de AcsN [85]. De los muchos trabajos de investigación que reportan la utilización de VLPs como plataformas de presentación de epítomos foráneos, solo algunos permiten la inserción de péptidos en bucles o regiones expuestas sin afectar el ensamblaje eficiente de la VLP. Algunos ejemplos exitosos son como los reportados por Rueda et al 1999 [251], donde la inserción en cualquiera de los cuatro bucles de la proteína VP2 del parvovirus canino demostró permitir un ensamblaje eficiente en VLP. El bucle L1 de Las VLPs del virus del papiloma bovino y humano también ha demostrado ser permisibles para la inserción de epítomos derivados de otros organismos [252, 253], aunque dependiendo del antígeno, algunas veces la conjugación química del epítomo a la VLP da mejores resultados [254]. Zhang et al 2007 [246], reporta la utilización de VLP de el virus de la hepatitis B como plataforma de presentación de epítomos B y T de VFA. De las tres construcciones evaluadas, solo una de ellas logró la correcta formación de VLPs y se

detectó diferencias en cuanto a la respuesta humoral y celular generada por ésta en comparación con aquellas proteínas recombinantes que no lograron formar las VLPs. Algunas VLPs como las derivadas del virus de la bursitis infecciosa sólo permite la inserción de epítomos cortos [243], mientras que otras VLPs como la del virus de la hepatitis B llegan a aceptar hasta 238 aa [255].

Dado que el isotipo de los Acs incide en la funcionalidad de los mismos [256-260] y condiciona los mecanismos inmunitarios efectores de la respuesta, decidimos evaluar los títulos de IgG1, IgG2a e IgG2b inducidos frente al epítomo B neutralizante del VFA. Como se muestra en la [Figura 4.5](#), los perfiles de Acs inducidos por las VLPs L-B y L-B/N-T (así como por N-BT) fueron similares. Con las tres construcciones la respuesta mayoritaria es de Acs IgG1 que en ratón están reguladas por una respuesta T cooperadora 2 (Th2) fundamentalmente por la producción de IL-4, aunque también hay producción de IgG2a, isotipo regulado por IFN γ producido por linfocitos T cooperadores 1 (Th1) e IgG2b, que es la subclase de IgG dominante en respuesta al desafío de VFA en ratones y relacionada con la respuesta celular mediada por Acs [261]. Nuestros resultados correlacionan con los obtenidos en un estudio llevado a cabo en ratones Balb/c [262], donde reportan un perfil de isotipo similar detectado después de la inmunización con la vacuna convencional de VFA formulada con hidróxido de aluminio. En este mismo estudio reportan que IgG2b es el isotipo predominante en los sueros de ratones infectados y en aquellos inmunizados frente a VFA que presentaron mayor porcentaje de resistencia al desafío viral. Lo que concuerda con la hipótesis de que a través del incremento de la actividad fagocítica mediada por Acs se puede alcanzar protección efectiva frente a VFA [263]. Otro estudio llevado a cabo en ratones [264] reporta que las diferentes respuestas inmunes tras la infección y la inmunización frente a VFA, son principalmente el resultado de la diferente masa viral presentada al sistema inmunitario. En definitiva estos reportes donde identifican un perfil de isotipo en ratón (más IgG2b) mayormente relacionado con la protección y la influencia de la cantidad y composición de la formulación vacunal, podrían contribuir a explicar la falta de correlación de la respuesta humoral mediada por la vacunación con las VLPs quiméricas y la protección parcial detectada en el modelo porcino, que se discutirá con mayor detalle más adelante.

La respuesta de Acs frente al sitio antigénico localizado en el bucle G-H de VP1 es T dependiente, lo que se ha demostrado en rumiantes infectados [265] como vacunados [144]. Vacunas peptídicas que reproducen el epítomo B SN1 de VFA, con o sin epítomos T cooperadores, igualmente han demostrado la necesidad de activación de los linfocitos T cooperadores [210, 266]. En el caso de las vacunaciones con la VLP quimérica de RHDV-VFA, la presencia del péptido T mencionado no fue determinante en la inducción de Acs frente al epítomo B del VFA, probablemente dado que epítomos indeterminados de la VP60 estén proporcionando la activación de la respuesta T cooperadora adecuada para ello. Este hecho se ha descrito previamente en la incorporación de epítomos foráneos a las VLPs del virus de la Hepatitis B o del Parvovirus porcino [40, 267]. Esta hipótesis se ve apoyada además en el hecho de que la inmunización con las VLPs quiméricas de RHDV induce respuesta anamnésica, es decir, se incrementa la respuesta de Acs frente al VFA tras el boost y se produce el cambio en la subclase del anticuerpo

inducido frente a VFA (inducción de Acs IgG1, IgG2a e IgG2b), ambos eventos relacionados con la correcta activación de la respuesta T cooperadora [186, 268, 269].

En correlación con los títulos de Acs anti-péptido B del VFA, todas las construcciones de VLPs quiméricas indujeron títulos de Acs neutralizantes (AcsN) frente al VFA (Fig.4.6). La construcción L-B/N-T fue la más eficiente, ya que todos los animales de este grupo alcanzaron títulos de AcsN > 2 log₁₀, por lo que se seleccionó esta construcción para su valoración en cerdo, hospedador natural del VFA.

Dada la relevancia de la inducción de respuesta inmune celular, tanto cooperadora como efectora, para una eficaz vacunación, evaluamos ésta mediante ensayos ELISPOT. Los resultados obtenidos muestran que todos los mutantes de VP60 que presentan epítomos de VFA son capaces de inducir una respuesta celular específica, aunque de magnitud baja, frente al VFA y el epítomo T de este virus (Fig.4.7). Estos datos correlacionan con los previamente obtenidos inmunizando cerdos con una VLP de RHDV que presentaba únicamente el epítomo T de VFA inserto en el NT [63]. Anteriormente nuestro grupo de investigación mostró, generando VLPs presentadoras del epítomo T de OVA, que el sitio de inserción en VP60 más adecuado para la inducción de respuesta celular óptima era el NT [89]. Aunque sin diferencias estadísticamente significativas, en este caso parece que la respuesta es algo mejor cuando el epítomo T de VFA está inserto en el bucle L. Este mismo resultado se obtuvo con VLPs quiméricas presentadoras del epítomo M2 del virus de la Gripe, donde las VLPs que presentaban ese epítomo en el bucle L indujeron mayores frecuencias de células productoras de IFN γ [64]

Al contrario que los epítomos B, que pueden ser reconocidos en su forma nativa [131], los epítomos T requieren de un procesamiento y posterior presentación en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase-I o clase- II. Por lo tanto, es posible que las diferencias encontradas sobre la activación de la respuesta celular mediada por el epítomo T inserto en VP60, se deban a diferencias en el procesamiento del péptido, que vendrán determinados por la secuencia del propio péptido T y las secuencias que lo flanqueen en su sitio de inserción en VP60 [66, 270].

Como mencionamos con anterioridad, el modelo de estudio porcino aporta datos de interés práctico en el desarrollo de vacunas frente al VFA. Por ello, decidimos valorar en cerdos domésticos la inmunogenicidad y protección frente al desafío viral conferida por la VLP seleccionada en el modelo murino. En correlación con los resultados obtenidos en ratón, esta VLP fue capaz de inducir también en cerdo, títulos elevados de Acs y AcsN específicos frente a VFA independientemente de las dos concentraciones de inmunógeno probadas (100 y 1000 μ g). La protección frente al VFA proporcionada por las vacunas basadas en virus inactivado correlaciona bien con el título sérico de AcsN en bovinos y en menor medida en porcinos [79-82]. En base a esto se han definido tres intervalos de títulos de AcsN que se asocian con una mayor o menor probabilidad a la protección [64], estimándose que títulos de AcsN ≥ 1.7 log₁₀ se asocian con mayor frecuencia a animales protegidos. Sin embargo, a pesar de que la VLP L-B/N-T evocó respuestas humorales específicas frente al VFA potentes (AcsN ≥ 2.5 log₁₀), la protección frente al desafío viral fue

parcial. Esta protección parcial se caracterizó fundamentalmente por un claro retraso en la aparición de lesiones (4 días) y la menor gravedad de las mismas, con diferencias estadísticamente significativas entre la severidad de las lesiones registradas en los animales control (no inmunizados) y los cerdos vacunados con la VLP quimérica. Estos resultados correlacionan con los obtenidos por Cubillos et al., 2012 [209], al inmunizar cerdos con péptidos sintéticos que reproducen estos mismos epítomos B y T de VFA, y con los resultados de Dong et al 2015 [36] y Xu et al 2017 [247], utilizando las VLPs de los bacteriófagos MS2 y T7 respectivamente, para presentar el epítomo B SN1 de VFA. En los tres experimentos, al igual que los nuestros, se indujo en cerdos una protección parcial a pesar de inducir títulos de AcsN considerados como protectores. Por otra parte, Wu et al 2003 [240], reporta la expresión del epítomo B SN1 de VFA utilizando como plataforma de expresión el virus del mosaico del tabaco. Cerdos inmunizados con 3 mg de inmunógeno formulado con hidróxido de aluminio como adyuvante, indujo la protección de los mismos basados en la falta de presentación de síntomas y la detección de Acs anti-VFA evaluados mediante un kit comercial. Ren et al 2008 [248], reporta que la expresión de la proteína precursora de las proteínas estructurales de VFA (P1) presentada a través de su inserción en la VLP del bacteriófago T4, es necesaria para conseguir el 100% de protección completa en comparación al 75% de protección conseguida con la misma estrategia vacunal expresando solo la proteína VP1 en un estudio llevado a cabo en ratones. La falta de correlación entre el título de AcsN y la protección inducida por inmunógenos distintos del virus inactivado ya se ha descrito previamente en diversas ocasiones [271-274]. La baja eficiencia biológica de los Acs inducidos por esos inmunógenos y la VLP L-B/N-T aquí descrita, podría atribuirse a diferencias en el mecanismo de neutralización que utilizan dichos Acs o bien a diferencias en su afinidad [275]. La determinación *in vitro* de los títulos de AcsN valora únicamente la neutralización directa de la capacidad infectiva del VFA en células susceptibles. Sin embargo, la inducción de Acs con capacidad de opsonización, que promuevan la fagocitosis de los complejos VFA-Acs, promoviendo la destrucción del VFA infectivo [263, 276, 277] se ha descrito como otro de los mecanismos efectores mediados por Acs, relevantes en la protección frente al VFA. El isotipo IgG2 está relacionado a los mecanismos de opsonización en la protección frente al VFA, ya que el isotipo IgG2 opsoniza y activa el complemento más eficientemente que los Acs de isotipo IgG1 [256, 257]. La determinación de los isotipos de los Acs inducidos es otro parámetro que se ha descrito como importante en la protección frente a VFA en los hospedadores naturales [259, 278]. Así, se han correlacionado las diferencias en las relaciones de isotipo IgG1/IgG2 en los Acs anti-VFA inducidos en animales infectados y vacunados con vacuna convencional con respecto a los encontrados en animales inmunizados con otros inmunógenos, como los péptidos sintéticos y con la falta de protección inducida por estos últimos [258]. Trabajos recientes publicados por nuestro grupo, han asociado la protección eficiente frente al VFA, conferida en cerdo por un péptido dendrimérico que reproduce los epítomos B y T insertos en la VLP L-B/N-T, con títulos elevados de Acs anti-VFA de isotipo IgG2 [211]. Dado que la VLP quimérica L-B/N-T fue capaz de inducir títulos elevados y similares de Acs específicos frente al VFA de ambos isotipos, incluyendo IgG2, no podemos atribuir la falta de protección completa frente al VFA inducida por esta VLP a la ausencia de Acs

teóricamente funcionales en procesos de opsonización. En cualquier caso, la capacidad opsonizante de los Acs inducidos por la VLP quimérica tendría que ser comprobada.

El VFA inicia la infección frecuentemente a través de mucosas [108, 112] lo que determina que la inducción de una respuesta efectiva de Acs IgA locales sea relevante para lograr una buena protección [208, 279, 280]. La VLP L-B/N-T indujo títulos detectables de IgA anti-VFA en suero, donde se alcanzaron títulos de entre 10^4 - 10^5 \log_{10} , similares a los obtenidos en estudios anteriores utilizando péptidos sintéticos dendriméricos [211]. Sin embargo solo se detectan Acs IgA anti-VFA en hisopos nasales tras la inoculación del virus, pero no tras la inmunización con la VLP L-B/N-T.

La falta de protección total observada podría deberse también al escape de VFA de los AcsN mediante la generación de mutantes escape. Este proceso se ha descrito anteriormente *in vivo* [281, 282] y se debe a la elevada variabilidad genética del VFA, que permite su comportamiento como cuasiespecies, adaptándose a presiones evolutivas tanto en cultivos celulares como *in vivo*. Al estar sometido a presión por un repertorio limitado de Acs, dirigidos a un único sitio neutralizante (de varios descritos), es relativamente fácil que se seleccionen o generen variantes minoritarias del virus capaces de resistir la acción de estos Acs, imponiéndose éstas y siendo capaces de extender la infección provocando la aparición de la patología.

Aunque no se pudieron aislar virus de los animales vacunados con la VLP L-B/N-T, para comprobar esta hipótesis, como aproximación sometimos el VFA a pases seriados en cultivo celular en presencia de sueros de los animales vacunados, así como de los controles correspondientes. Los resultados obtenidos muestran que tras diez pases, 3/4 poblaciones de cuasiespecies virales mostraron cambios en los aminoácidos de la secuencia original de la proteína VP1 de VFA, y dos de ellas, con resistencia parcial a la neutralización (Tabla 4.1). Las mutaciones encontradas en nuestros experimentos se reflejaron tanto fuera (residuos E-83-K y R-172-W) como dentro de la región del bucle G-H (residuos V-144-A y L-148-P). Ninguna de estas mutaciones se generó con sueros control (negativos frente a VFA), mientras que la mutación en la posición 144 se generó además con el suero de uno de los animales infectados no vacunados. Los virus recuperados luego de 10 pases mostraron resistencia a la seroneutralización a 3 de los 4 sueros de animales inmunizados con la VLPs quimérica RHDV-VFA.

Estos resultados correlacionan con los de otros autores que han caracterizado mutantes de escape de VFAs de serotipo O y han identificado mutaciones en las posiciones 144 y 148, que correlacionan con la resistencia completa o parcial a la neutralización: L-148-R y L-144-S [283], L-148-R [284] y X144X [285]. Por otra parte, Shimmon et al 2018 [286], identifica al menos tres residuos de VP1 implicados con la unión a Acs: residuos 144, 148 y 154, pero solo la sustitución L-148-R, dio como resultado una resistencia completa a la neutralización. Todos estos datos, incluyendo nuestros resultados, parecen indicar que los aa 144 y 148 son críticos para ser reconocidos por los Acs y ejercer su actividad neutralizante. Además, el residuo 148 de VP1 es importante para el reconocimiento de integrinas (uno de los receptores de VFA) y forma parte del sitio de unión que incluye además los residuos en las posiciones RGD+1 y RGD +4

Burman et al 2006 y Dicara et al 2008 [287, 288]. Por tanto estos hallazgos *in vitro*, sugieren que otra posible explicación a la protección parcial inducida por la VLP, con retraso y disminución de la sintomatología de FA, pueda deberse a la selección de una población de quaciespecie mutante que escapó de la respuesta inmune generando una infección productiva.

Además de los mecanismos humorales, otros mecanismos del sistema inmune pueden estar contribuyendo a la eliminación del virus, como son los mecanismos efectores de la respuesta celular. Aunque el papel de estos mecanismos en la protección frente a VFA es motivo de controversia, son numerosos los trabajos en los que se ha descrito la activación de respuestas T específicas tanto en bovinos como porcinos, tras la infección con el VFA o la vacunación con el virus inactivado [289-294]. Los epítomos T pueden ser cooperadores, esenciales para potenciar y regular la respuesta inmune adaptativa o linfocitos T citotóxicos (CTL). Comúnmente, las infecciones virales se caracterizan por la inducción de CTL, pero la función de CTL en la inmunidad contra VFA no está claramente definida. Algunos autores reportan una mínima actividad CTL tras la infección con VFA [291], mientras que otros como Patch et al 2013 [146], han demostrado que cerdos infectados con VFA, desarrollan una respuesta CTL clara y medible, y que es posible modularla a través de la vacunación [289, 292], lo que podría resultar en una mejora de la capacidad de las vacunas de subunidades para controlar la replicación del virus después del desafío viral. Algunos autores indican que la inmunidad innata y celular en etapas tempranas durante el proceso de infección de VFA es tan relevante, que el propio virus ha desarrollado numerosos mecanismos para evadir esta respuesta [124, 290, 294]. Asimismo, se reporta que durante la infección aguda de VFA, se incrementa la secreción de IL10 por las células dendríticas (DCs), que repercute en la inmunosupresión detectada en cerdos, a tiempos cortos tras la infección [295].

Nuestros resultados muestran que la VLP quimérica L-B/N-T solo es capaz de inducir una respuesta celular efectora específica frente a VFA limitada, ya que la frecuencia de células productoras de IFN γ frente a epítomos de VFA es muy baja en los animales inmunizados. Este resultado difiere de la respuesta celular activada en cerdo cuando el epítomo T de VFA se presenta en un péptido sintético dendrimérico que además confirió protección completa frente al desafío viral [211]. Esto sugiere que la protección parcial conferida por la VLP L-B/N-T probablemente mejoraría significativamente si además de la respuesta potente de Acs que induce, también indujera una frecuencia elevada de células productoras de IFN γ , específicas frente al VFA.

Estas diferencias encontradas entre la vacuna dendrimérica y la desarrollada con la VLP de RHDV en esta tesis se pueden atribuir a diferencias en la eficiencia de procesamiento y presentación del epítomo T, ya que en ambos estudios se utilizaron poblaciones de cerdo domésticas, que tienen la misma distribución de alelos en sus moléculas de MHC. En el péptido sintético el procesamiento del epítomo se facilita incluyendo en su extremo CT, un sitio de corte de catepsinas, que una vez en el interior celular facilitará la liberación del epítomo adecuado [296]. En el caso de la VLP, el epítomo se insertó en el extremo NT de VP60 con una separación de dos aa (GS). Aunque la inclusión de un sitio de corte como

el descrito entre VP60 y el epítipo T es una posibilidad, se desestimó inicialmente por la posibilidad de que este procesamiento afectara negativamente a la formación de la VLP.

Varias estrategias pueden desarrollarse para mejorar la eficacia de la VLP de RHDV: 1) Aumentando el número total de epítopos presentados por unidad de VLP, 2) Mejorando el procesamiento de los epítopos presentados por las APC, y 3) Mediante la funcionalización de la VLP para mejorar la captación por las APC. Recientemente, Kramer et al 2019 [66] reportan estrategias para mejorar la funcionabilidad de la respuesta celular generada utilizando como plataforma de presentación las VLP de RHDV. En este caso se describe que la incorporación de al menos 2 copias de un epítipo T por unidad de VP60, es necesaria para inducir una respuesta celular eficiente. Adicionalmente, la incorporación de un “linker” alanina-leucina-leucina (ALL) en el extremo CT del epítipo, mejora el procesamiento del epítipo T estudiado. Además, mediante conjugación química a la VLP de mono y di manósidos, utilizados como dianas para el receptor de manosa, aumenta la internalización de la VLP de RHDV por fagocitosis y macropinocitosis. Estos abordajes podrían trasladarse al caso de las VLPs quiméricas RHDV-VFA, aunque en esta tesis hemos seguido tres alternativas diferentes: 1) Evaluación de un agonista RIG-I como adyuvante estimulador de la respuesta innata [229]; 2) Generación de una nueva VLP presentadora de una versión elongada del epítipo T de VFA, que permitiese favorecer la presentación del péptido T original (3A₂₅₋₃₅) [297], como la incorporación de otro péptido T (3A₂₆₋₄₀) ampliamente reconocido en poblaciones de cerdos domésticos [148]; y 3) Generación de un adenovirus recombinante que expresa la proteína 3D de VFA, descrito como inductor de la respuesta celular en bovinos y porcinos [149, 298].

5.3. Estrategias para mejorar la respuesta celular específica frente a VFA inducida por VLPs quiméricas de RHDV que presentan epítopos de VFA; utilización como adyuvante un compuesto agonista de RIG I

La incorporación de adyuvantes en las formulaciones de vacunas de subunidades es importante para la inducción de una respuesta inmune adecuada. Así la inmunidad y la capacidad protectora producidas por las vacunas pueden variar notablemente de acuerdo con los tipos de adyuvantes que se utilizan [168]. Borrego et al 2017 [213], reportó que la administración de un RNA sintético, derivado de una secuencia del extremo 5' no codificante de VFA, mejoró las respuestas inmune B y T específicas mediada por una dosis sub-óptima de la vacuna convencional frente a VFA en cerdos. Nuestros resultados en ratones, indican que la presencia de Montanide 50V2 (para emulsión agua en aceite) no es crítica para la inducción de una respuesta humoral específica en la vacuna basada en las VLPs de RHDV (Figura 4.4). Así mismo, Crisci et al 2009, señalan que las VLPs quiméricas de RHDV son capaces de inducir una respuesta celular citotóxica, cuando presenta un epítipo modelo de OVA, sin adyuvante. No obstante, nuestros resultados indican que la presencia de Montanide favorece la inducción de una respuesta humoral más potente (títulos de Acs más altos), pero no de una respuesta celular. Cuando comparamos Montanide 50V2 con un agonista de RIG-I, el compuesto M8, vemos que a pesar de que M8 favoreció la

inducción de una respuesta celular ([Figura 4.26](#)), esta mejora fue en detrimento de la activación de una respuesta humoral reproducible entre los animales inmunizados ([Figura 4.23](#) y [4.25](#)). La naturaleza oleosa del adyuvante Montanide, que favorece la formación de depósitos de inmunógeno una vez que se aplican y la liberación más continuada en el tiempo permiten una inducción de la respuesta humoral más potente en comparación con adyuvantes acuosos como es el caso de M8. Barnett et al 1996 [[299](#)] reporta que el uso de Montanide como adyuvante oleoso en la preparación de la vacuna convencional de VFA, aumenta su inmunogenicidad en cerdos, reteniendo la potencia durante periodos más largos que la formulación de la vacuna convencional con adyuvante acuoso. Dar et al 2013 [[171](#)], en un estudio llevado a cabo en bovinos, demuestra que Montanide mejora la respuesta inmune y protección frente a VFA. Park et al 2014 [[300](#)], demuestra que las emulsiones de la vacuna convencional de VFA que contenían conjuntamente un adyuvante de aceite en agua y otro adyuvante basado en hidróxido de aluminio, mejoró la respuesta inmune en cerdos y ovejas. Barrera et al 2018 [[194](#)], reporta que una vacuna de subunidad basada en AdV recombinante frente a una cepa A24 Cruzeiro de VFA formulada con un adyuvante lípido/polímero, aumentó el potencial de la vacuna, al inducir títulos más altos de AcsN y protección al desafío viral en bovinos, en comparación con la vacuna administrada sin adyuvante. Por tanto creemos adecuada la inclusión de Montanide 50V2 en la formulación de las vacunas para VFA basadas en las VLPs de RHDV y sería interesante valorar la posibilidad de formular la VLP quimérica con los dos adyuvantes (Montanide 50V2 y M8), y comprobar que sus potenciales actúan sinérgicamente para conseguir potenciar la respuesta humoral y la celular.

5.4. Estrategias para mejorar la respuesta celular específica frente a VFA inducida por VLPs quiméricas de RHDV que presentan epítomos de VFA; elongación del epítomo T de VFA presentado por la VLP quimérica de RHDV (L-B/NT-2)

La construcción L-B/N-T2 induce una potente respuesta humoral, incluyendo la producción de AcsN frente a VFA ([Figuras 4.18](#) y [4.20](#)), a una magnitud comparable con la construcción homóloga L-B/N-T. Estos datos sugieren que la modificación de la versión original del epítomo T no perjudicó la inducción de una respuesta humoral específica y potente frente al VFA. Fang et al 2015 [[301](#)], en una vacuna basada en una proteína recombinante que presenta epítomos B y T de VFA, sugieren que la inclusión de dos epítomos T de la proteína VP1 fue crucial para la potencia demostrada por dicha vacuna. Nuestros resultados indican que al elongar la secuencia del epítomo T presente en la VLP se evidenció una mejora de la inducción de respuesta celular específica de VFA, demostrado por el incremento del número de células productoras de IFN γ frente al estímulo del péptido T ([Figura 4.21](#)). La inmunización de cerdos con esta construcción, indujo también una mejora en la respuesta celular específica frente al VFA, valorada mediante un ensayo de linfoproliferación, estimulando *in vitro* con el péptido T, con respecto a los cerdos inmunizados con la VLP L-B/N-T. Sin embargo, no se detectó una respuesta de producción de IFN γ frente al péptido T 3A₂₁₋₃₅. Este contraste podría deberse a que el reconocimiento de los epítomos por

linfocitos de diferentes especies e individuos está restringido por el polimorfismo de las moléculas de MHC, que determinan el uso de distintos epítomos más proclives a una activación linfoproliferativa (generalmente vinculada a producción de IL2) que a una respuesta efectora (productora de IFN γ).

Sabemos que la expresión de IFN γ es un marcador para identificar una respuesta T cooperadora tipo 1. Zhang et al 2002 [302], reportan que la producción de IFN γ estimula la expresión de MHC en células presentadoras de antígenos e inhibe eficientemente la replicación de VFA, mientras que Parida et al 2006 [303] y Oh et al 2012 [293], correlacionan la producción de IFN γ con la protección ante el desafío viral en bovinos. En el modelo porcino Patch et al 2013 [146] y Díaz- San Segundo et al, 2014 [197], demuestran la importancia de la respuesta celular específica durante la infección con VFA, al demostrar cómo en ausencia de AcsN, la respuesta celular retrasa la aparición de la sintomatología clínica e inhibe la viremia. La potente producción de IFN γ específica frente a la proteína VP60, tanto en el modelo murino como porcino, mediada por la VLP quimérica RHDV-VFA, ha demostrado que por sí misma, las VLPs de RHDV son altamente inmunogénicas y capaces de inducir este tipo de respuesta. No podemos descartar, que la pobre respuesta celular inducida frente al epítomo T de VFA se deba a la inmunodominancia de epítomos T de VP60, jerárquicamente más potentes que el T de VFA, los cuales compitan con este por su presentación en las moléculas MHC de clase I o II [304]. Esto explicaría las respuestas celulares potentes inducidas frente a los epítomos T de OVA, los del virus de la gripe (M2 y NP) y los T-tumorales, presentados en VLPs quiméricas de RHDV [64, 66, 89], pero no frente al epítomo T de VFA.

La inmunización con la VLP L-B/N-T2 en cerdos confirió protección parcial frente al desafío con VFA, similar a la inducida por la construcción L-B/N-T, aunque con características distintas. La inmunización con la construcción L-B/N-T dio como resultado una reducción y retardo de la sintomatología clínica desarrollada por todos los cerdos inmunizados (Figura 4.14), mientras que la inmunización con la VLP L-B/N-T2 además de esto, también indujo protección completa en la mitad de los animales inmunizados (Figura 4.31). Experimento llevado a cabo en cerdos inmunizados con una estrategia vacunal utilizando como plataforma de presentación del epítomo B de VFA, el virus del mosaico del bambú quimérico, reportó que los cerdos inmunizados con una sola dosis de 1 mg de la vacuna, se protegieron frente a la exposición de VFA [241]. Una diferencia con nuestros experimentos es que su construcción vacunal contiene los residuos 128-164 de VP1 de VFA, por lo que incluyen además del epítomo B SN1, un epítomo T, que indujo además de títulos de AcsN similares a los nuestros, la expresión específica de IFN- γ evaluado mediante un ensayo de la producción de IFN- γ por PCR en tiempo real. Asimismo, en un experimento llevado a cabo en ratones expresando una versión elongada del epítomo B SN1 utilizando el bacteriófago MS2 como plataforma de expresión, se indujeron concentraciones de IFN- γ e IL-2 más elevadas en comparado con vacunas peptídicas para VFA [37]. Pan et al 2016, desarrolla una estrategia vacunal expresando una serie de epítomos B y T derivados de la proteína VP1 de VFA utilizando como plataforma de presentación VLPs del parvovirus porcino expresado mediante el sistema de adenovirus recombinante [244]. La inmunización con esta VLP quimérica indujo tanto respuesta humoral (títulos altos

de Acs anti VP1 y AcsN) como celular (linfoproliferación), además de protección completa ante el desafío viral en cerdos. En conjunto estos resultados indican que la falta de protección completa obtenida con las construcciones L-B/N-T y L-B/N-T2 puede deberse al hecho de que a pesar de inducir AcsN, que son imprescindibles para la protección, sólo se indujo una débil respuesta de células T específica a VFA, en términos de producción de citoquinas antivirales, que parece ser crucial para conferir protección clínica en el hospedador natural [290, 291, 303], sobretodo en la inmunización con vacunas de subunidades.

5.5. La inmunización con un sistema de vacunación prime-boost utilizando el rAdV 3D y VLP quimérica RHDV-VFA potencia la respuesta celular frente al VFA en el modelo murino

La utilización de vectores virales recombinantes de Adenovirus es una estrategia vacunal exitosa para la inducción de respuesta celular. Por ello, en esta tesis se ha generado por primera vez un rAdV-3D, que expresa la proteína 3D del VFA. Esta proteína se ha demostrado que contiene epítomos T capaces de activar la respuesta celular, tanto en bovinos [155, 298] como porcinos [148, 149, 156, 305] infectados con el VFA.

Con una estrategia similar pero utilizando como vector viral el virus vaccinia, García-Briones et al 2004 [149], demostró que el vaccinia recombinante que expresaba la proteína 3D, era capaz de conferir la protección parcial frente al desafío con VFA. Así mismo, Cedillo-Barrón et al 2001 [157], reporta que la co-expresión de la polimerasa 3D junto con proteínas de la cápsida de VFA, aumenta la capacidad protectora conferida por las VLPs de VFA solas. Liao et al 2013 [306], mediante un estudio de predicción computacional, identificó 22 epítomos T citotóxicos (CTL) reconocidos por cerdos a partir de 1711 secuencias de VFA pertenecientes al serotipo O, de los cuales 8 fueron localizados en la proteína 3D. En un estudio más reciente, Painter et al 2015 [307], demuestra que la expresión transgénica de RNA polimerasa dependientes de RNA (RdRP) de un picornavirus (TMEV) en ratones, produce un drástico aumento en la expresión genes estimulados por IFN (ISGs), potenciando la activación de una respuesta innata y favoreciendo así una protección antiviral de amplio espectro. En esta tesis se muestra la generación de un adenovirus recombinante capaz de expresar la proteína 3D de VFA (Figura 4.33). La inmunización de ratones con este virus recombinante dio como resultado la activación de una respuesta celular potente y específica frente a la proteína 3D, evaluada mediante ELISPOT para determinar la frecuencia de células productoras de IFN γ (Figuras 4.35 y 4.42). Tras la inoculación con VFA de los animales inmunizados con rAdV-3D, todos los grupos de ratones sucumbieron ante la infección con VFA serotipo C. Estos resultados indican que a pesar de la potente y específica respuesta celular inducida por el virus recombinante, ésta por sí sola no es capaz de controlar la infección con VFA.

Por ello decidimos evaluar la efectividad de una formulación vacunal combinada, en la que los animales se inmunizan con la VLP quimérica L-B y con el rAdV-3D, para aunar la potente respuesta inmune, humoral y celular, conferida por cada una de las estrategias vacunales por separado. Primeramente decidimos evaluarlo en el modelo murino. Para ello, generamos una VLP quimérica RHDV-VFA que

incorpora el péptido B SN1 correspondiente al serotipo C de VFA ([Figura 4.37](#)), puesto que es el serotipo capaz de inducir una infección letal en este modelo de estudio *in vivo*. Tras la inmunización de los ratones, los resultados obtenidos demuestran que la estrategia prime-boost heteróloga: VLP RHDV-VFA mas rAdV-3D y viceversa, ha sido capaz de: 1) Generar una potente respuesta humoral demostrada por la inducción de niveles altos de Acs anti péptido B de VFA ([Figura 4.39](#)), además de títulos elevados de Acs capaces de neutralizar al virus ([Figura 4.41](#)). 2) inducir una potente respuesta celular específica a la 3D de VFA, como indica la expresión de IFN γ ([Figura 4.42](#)). Tras la administración con VFA, todos los animales inmunizados con L-B C S8c1 sobrevivieron a la infección viral, independientemente de la presencia de AdV-3D o AdV-lacZ, mientras que más de la mitad (3/5) de los animales murieron entre el día 2 y el día 7 post infección en los grupos control L-B OUK + rAdV-LacZ y PBS ([Figura 4.43](#)). Este resultado indica que la inmunización con la VLP portadora del epítipo derivado del serotipo C es capaz de inducir un grado de protección frente al desafío con el virus homólogo, aunque las condiciones del ensayo no permiten determinar el efecto sobre la protección de la vacunación combinada con el rAdV-3D. Para esto será necesario incrementar la dosis del virus utilizada para el desafío.

Los protocolos de inmunización prime-boost heterólogos han demostrado ser enfoques exitosos para la protección contra diferentes enfermedades en ensayos preclínicos e incluso clínicos [308]. El éxito obtenido con el sistema prime-boost heterólogo evaluado en esta tesis doctoral concuerda con los resultados obtenidos por Gullberg et al 2017 [188], donde reportan protección completa en bovinos inmunizados primero con VLPs de VFA expresadas utilizando como vector viral un alfavirus defectivo, y luego un boost con VLPs de VFA recombinantes obtenidas por otro sistema de expresión. Por otro lado Moraes et al 2011 [190], reporta la mejora de la eficiencia de protección vacunal en cerdos, al incorporar la proteína no estructural 2B, asociado a una respuesta celular, en la formulación original de una vacuna basada en la expresión de la cápsida viral de VFA utilizando como vector adenovirus recombinante. Por tanto, la potente respuesta celular obtenida con el rAdV-3D podría haber contribuido en la eliminación de la infección viral. Sin embargo, el efecto conseguido tras la inmunización de rAdV-3D y la VLP quimérica RHDV-VFA requiere de más estudio para definir las bases moleculares de la protección observada. Dado que no siempre existe una correlación entre la inmunogenicidad y protección valorada en el modelo murino y en el de un hospedador natural del VFA, será necesario confirmar estos resultados realizando experimentos en el modelo porcino.

En esta tesis doctoral generamos un rAdV que expresa la proteína 3D de VFA completa, puesto que el sistema de presentación utilizada lo permitía y así podíamos asegurar de incluir un repertorio amplio de epítopos T. Sin embargo, los epítopos responsables de inducir una respuesta celular dentro de la proteína 3D de VFA ya están identificados [148, 149, 156]. El análisis realizado sobre los resultados obtenidos por estos estudios, nos hace llamar la atención hacia el epítipo T identificado entre las posiciones 346-370 de la 3D del serotipo C de VFA, puesto que es reconocido por poblaciones de cerdos consanguíneas (inbred) y naturales (outbred). Además Carillo et al 2005 [218], reporta que 21 de los 25 residuos que

conforman este epítipo, son invariables en un estudio donde se compara 133 cepas diferentes de VFA, lo que indica que podría proveer una inducción celular específica entre serotipos. De hecho, ya Zhang et al 2015 [309], mediante un estudio utilizando vacunas peptídicas, compara el péptido T derivado de la proteína 3A utilizado en esta tesis doctoral, con el epítipo T (346-370) de la 3D, incorporando ambos epítipos T juntos o individualmente en presencia del epítipo B (bucle G-H de la VP1) derivados del VFA serotipo A. Los resultados obtenidos reportan niveles más altos de inmunogenicidad e inmunoprotección de la vacuna peptídica que lleva el epítipo T-3D que aquella con el epítipo T-3A. En el futuro se podría contemplar la posibilidad de incorporar este péptido T (346-370) de la 3D de VFA en nuestra estrategia vacunal basada en VLPs quiméricas de RHDV y evaluar su efecto en la inducción de una respuesta celular y protección utilizando una sola estrategia vacunal. No obstante, con un sistema “prime-boost” como el evaluado en esta tesis, que utiliza reactivos que pueden generarse y utilizarse fuera de instalaciones de alta contención, ofrece ventajas significativas con respecto a la vacuna convencional.

5.6. Vacunas multiméricas frente a VFA basadas en VLPs quiméricas de RHDV que presentan epítipos B heterólogos simultáneamente

La versatilidad de la VLP de RHDV para presentar epítipos B en el sitio de inserción correspondiente al bucle L2 fue demostrada utilizando como modelo el péptido B SN1 de la cepa O UKG/01 de VFA. La inserción del péptido B en el L2 de RHDV, fue capaz de inducir una respuesta humoral específica, incluyendo AcsN frente a VFA. Aunque las diferencias en el título de Acs con el mutante de inserción homólogo en el bucle L, no fueron estadísticamente significativas, parece que el sitio de inserción L induce títulos más altos de Acs (Figuras 4.47 y 4.48). En esta tesis doctoral, se demuestra por primera vez, la aplicabilidad del sitio de inserción L2 dentro del subdominio P2 de la proteína VP60 de RHDV para la presentación de epítipos de interés. Datos no publicados de nuestro grupo de investigación han confirmado esta hipótesis utilizando como modelo el epítipo B de calicivirus felino.

Comprender y superar la barrera de la protección de vacunas específicas de serotipo y subtipo es una de las prioridades en la investigación de las vacunas para VFA [170]. El último conjunto de experimentos tuvo como objetivo evaluar la capacidad de las VLPs quiméricas de RHDV-VFA de presentar simultáneamente dos péptidos B pertenecientes a serotipos distintos incorporados en la misma partícula. Para ello se seleccionaron como epítipos, el bucle G-H de la proteína VP1 de las cepas A22 IRQ y O UKG/01 de VFA por ser pertenecientes a serotipos ampliamente distribuidos y de gran relevancia. Nuestros resultados muestran que el sistema de presentación basado en VLPs quiméricas de RHDV-VFA, logra presentar simultáneamente dos epítipos B de VFA. Sin embargo, la inmunogenicidad generada es más consistente frente a A22 IRQ que a O UK cuando se presentan en la misma partícula, siendo mejor cuando es presentado de manera independiente. No obstante, a pesar de que la respuesta alcanzada frente al serotipo O UK fue menos consistente (3/5 animales respondieron), en aquellos ratones donde se indujo dicha activación humoral, fue del mismo orden de magnitud que en la

construcción que presenta su epítipo B O UK sólo ([Figuras 4.52 y 4.53](#)). Por otro lado, los títulos anti VP60 obtenidos con la construcción doble, se ven disminuidos en comparación a sus construcciones quiméricas homólogas que incorporan los epítipos solos ([Figura 4.52](#)), lo que es esperable, puesto que al cambiar la secuencia de las dos regiones más inmunodominantes de la cápsida de RHDV, podría desmejorar el reconocimiento de la proteína VP60, demostrando que la inserción de dichos epítipos es correcta. Sin embargo, no podemos descartar que la presentación simultánea pudiera haber afectado la conformación de dichos epítipos y así su presentación, lo que podría contestar porque la inducción de Acs específicos más consistente en las construcciones que presentan los epítipos de manera separa en comparación con la construcción con doble inserción. Un estudio de inmunización *in vivo* administrando un coctel de estas VLPs quiméricas en los mismos individuos deberá ser realizado para corroborar esta hipótesis.

Estos datos coinciden con lo descrito sobre la conocida inmunogenicidad inferior del antígeno viral del serotipo O de VFA en comparación con el del serotipo A [[310, 311](#)]. De hecho, las vacunas comerciales para serotipo O suelen tener entre 4 a 5 veces más antígeno que aquellas para serotipo A. Black et al 1986 [[312](#)] reporta, en un experimento inmunización-desafío llevado a cabo en bovinos, que el serotipo A es hasta 30 veces más inmunogénico que el serotipo O, lo que podría ser otro factor por el cual 5/5 ratones inmunizados con la construcción doble fue capaz de inducir Acs específicos al A22 IRQ y 3/5 al serotipo O UK. Asimismo, Q. Wu et al 2003 [[240](#)], al diseñar un adenovirus recombinante que co-exprea la proteína precursora de las proteínas de la cápsida de dos cepas de VFA, representantes de los serotipos O y A. Porcinos inmunizados con este rAdV bivalente generaron AcsN frente ambos virus. Sin embargo, la respuesta alcanzada fue considerablemente más baja que la inducida por la vacuna comercial polivalente o la vacuna adenoviral monovalente frente a cada serotipo por separado. Además, el título frente al serotipo A de VFA, permaneció estable mientras que el título frente al serotipo O disminuyó con relativa rapidez después de la última inoculación. Lee et al 2017 [[313](#)], reporta el desarrollo de una vacuna peptídica sintética, basada en el bucle G-H de 5 cepas distintas de serotipo O y el epítipo T 3A utilizado en esta tesis doctoral, producidos en tándem para crear una única proteína. La inmunización de ratones reveló una respuesta humoral específica para cada cepa viral del cual deriva cada epítipo B introducido en la vacuna, sin embargo datos relevantes como la inducción de AcsN y el estudio en un hospedador natural de VFA quedan por estudiarse. Otras observaciones como las mostradas por Rieder et al 1994 [[314](#)], se podrían tomar en consideración para el desarrollo de estrategias vacunales basadas en VLPs quiméricas. Rieder desarrolló virus quimeras basados en un aislado del serotipo A mutante, que substituye la secuencia codificante de bucle G-H de la VP1 original de serotipo A por las de los serotipos O y C respectivamente. Vacunaciones llevadas a cabo en cobayos y porcinos con estos virus quimera inactivados, indujeron Acs específicos frente a los tres serotipos. Tras el desafío viral, alcanzaron protección frente al serotipo A y protección parcial frente al serotipo C, demostrando la importancia de la inclusión de otros epítipos B además del conocido sitio neutralizante 1

para conferir protección completa en cerdos. Por otro lado, Taboga et al 1997 [281], sostiene que la vacunación con estrategias que abarquen un solo o un número limitado de epítomos B, favorece la selección viral de mutantes de escape. Shao et al 2011 [315], mediante la inmunización con una vacuna multi-epítomo reporta que la inmunogenicidad de los epítomos puede mejorarse significativamente al aumentar el número de epítomos antigénicos. Por tanto, a pesar de que necesitamos datos más concluyentes, podemos decir que los resultados obtenidos en esta tesis doctoral aporta información relevante para el estudio del sistema de presentación basado en VLPs quiméricas de RHDV-VFA, que nos permita mejorar su eficiencia de presentación simultánea de epítomos B heterólogos. El uso de VLPs RHDV puede superar la limitación potencial del número de epítomos distintos en la misma partícula, ya que hemos demostrado que estas estructuras permiten la incorporación de diferentes epítomos B en una única molécula. Por otro lado, dada las restricciones del uso y producción de VFA infectivos, otro potencial uso de las VLPs RHDV-VFA quiméricas es su utilización como un antígeno alternativo en ensayos de diagnóstico. Hema et al 2007 [242], desarrolla una VLP quimérica de un tymovirus que presenta epítomos derivados de las proteínas no estructurales de VFA y su uso para la detección de diferencias entre animales vacunados e infectados. Rémond et al 2009 [243], reporta el uso de la VLP derivada del virus de la bursitis infecciosa presentadora del epítomo B SN1 de VFA como una herramienta diagnóstico. Creemos que las VLPs de RHDV son una alternativa interesante para explorar como estrategia terapéutica para diferentes enfermedades infecciosas y autoinmunes, dada a la versatilidad de permitir la combinación de diferentes epítomos, capaces de estimular al mismo tiempo diferentes ramas del sistema inmunológico, ser antigénica para múltiples serotipos o diferentes agentes infecciosos simultáneamente. Además en el caso de virus RNA con una gran capacidad de mutación, como es el caso de VFA, para el desarrollo de inmunógenos que contengan el repertorio completo de sitios antigénicos presentes en la partícula viral intacta, como también de reducir la posibilidad de selección de variantes antigénicas de las quasiespecies.

Capítulo 6

Conclusión



Las principales conclusiones y aportaciones de este trabajo son las siguientes:

1. Se han generado VLPs derivadas de RHDV que presentan de manera eficaz un epítipo relevante del serotipo O del VFA, induciendo una respuesta neutralizante comparable o superior a la obtenida mediante vacunación convencional en ganado porcino
2. Las VLPs derivadas de RHDV constituyen una plataforma eficaz para la presentación de epítopos e inducción de respuestas neutralizantes frente a, al menos, tres serotipos de VFA distintos
3. Se ha generado un adenovirus recombinante capaz de inducir una respuesta celular específica frente a la proteína 3D del VFA , altamente conservada entre serotipos, que podría utilizarse para potenciar la eficacia de vacunas convencionales o de nueva generación

Capítulo 7

Bibliografía



Bibliografía

1. Hoelzer, K., et al., *Vaccines as alternatives to antibiotics for food producing animals. Part 1: challenges and needs*. Vet Res, 2018. **49**(1): p. 64.
2. Hoelzer, K., et al., *Vaccines as alternatives to antibiotics for food producing animals. Part 2: new approaches and potential solutions*. Vet Res, 2018. **49**(1): p. 70.
3. Jorge, S. and O.A. Dellagostin, *The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches*. Biotechnology Research and Innovation, 2017. **1**(1): p. 6-13.
4. Pattnaik, B., et al., *Foot-and-mouth Disease: Global Status and Future Road Map for Control and Prevention in India*. Vol. 1. 2012.
5. Roeder, P., J. Mariner, and R. Kock, *Rinderpest: the veterinary perspective on eradication*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2013. **368**(1623): p. 20120139.
6. Freuling, C.M., T.F. Müller, and T.C. Mettenleiter, *Vaccines against pseudorabies virus (PrV)*. Veterinary Microbiology, 2017. **206**: p. 3-9.
7. Mariner, J.C., et al., *The Opportunity To Eradicate Peste des Petits Ruminants*. The Journal of Immunology, 2016. **196**(9): p. 3499.
8. Delany, I., R. Rappuoli, and E. De Gregorio, *Vaccines for the 21st century*. EMBO Mol Med, 2014. **6**(6): p. 708-20.
9. Meeusen, E.N., et al., *Current status of veterinary vaccines*. Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(3): p. 489-510, table of contents.
10. Kushnir, N., S.J. Streatfield, and V. Yusibov, *Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development*. Vaccine, 2012. **31**(1): p. 58-83.
11. Link, A., et al., *Innate Immunity Mediates Follicular Transport of Particulate but Not Soluble Protein Antigen*. The Journal of Immunology, 2012. **188**(8): p. 3724.
12. Fietze, K.M., D.S. Peabody, and B. Chackerian, *Engineering virus-like particles as vaccine platforms*. Curr Opin Virol, 2016. **18**: p. 44-9.
13. Crisci, E., J. Bárcena, and M. Montoya, *Virus-like particles: The new frontier of vaccines for animal viral infections*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2012. **148**(3): p. 211-225.
14. Shi, L., et al., *GARDASIL: prophylactic human papillomavirus vaccine development--from bench top to bed-side*. Clin Pharmacol Ther, 2007. **81**(2): p. 259-64.
15. Zhai, L. and E. Tumban, *Gardasil-9: A global survey of projected efficacy*. Antiviral Research, 2016. **130**: p. 101-109.
16. Keating, G.M. and S. Noble, *Recombinant hepatitis B vaccine (Engerix-B): a review of its immunogenicity and protective efficacy against hepatitis B*. Drugs, 2003. **63**(10): p. 1021-51.
17. Fachinger, V., et al., *The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex*. Vaccine, 2008. **26**(11): p. 1488-99.
18. Kim, H., et al., *Recent vaccine technology in industrial animals*. Clin Exp Vaccine Res, 2016. **5**(1): p. 12-18.
19. Lindesmith, L.C., et al., *Particle Conformation Regulates Antibody Access to a Conserved GII.4 Norovirus Blockade Epitope*. Journal of Virology, 2014. **88**(16): p. 8826.
20. Barcena, J., et al., *Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and new RHDV2 virus antigenicity, using specific virus-like particles*. Vet Res, 2015. **46**: p. 106.
21. Zdanowicz, M. and J. Chroboczek, *Virus-like particles as drug delivery vectors*. Acta Biochim Pol, 2016. **63**(3): p. 469-73.

22. Ramqvist, T., K. Andreasson, and T. Dalianis, *Vaccination, immune and gene therapy based on virus-like particles against viral infections and cancer*. Expert Opinion on Biological Therapy, 2007. **7**(7): p. 997-1007.
23. Fan, Y. and J.J. Moon, *Nanoparticle Drug Delivery Systems Designed to Improve Cancer Vaccines and Immunotherapy*. Vaccines, 2015. **3**(3): p. 662-685.
24. Crisci, E., J. Bárcena, and M. Montoya, *Virus-like particle-based vaccines for animal viral infections*. Inmunología, 2013. **32**(3): p. 102-116.
25. Tseng, Y.-T., et al., *SARS-CoV envelope protein palmitoylation or nucleocapid association is not required for promoting virus-like particle production*. Journal of biomedical science, 2014. **21**(1): p. 34-34.
26. Fan, Y. and J. Moon, *Particulate delivery systems for vaccination against bioterrorism agents and emerging infectious pathogens*. Vol. 9. 2016.
27. Liu, F., et al., *Virus-like particles: potential veterinary vaccine immunogens*. Research in Veterinary Science, 2012. **93**(2): p. 553-559.
28. Brune, K.D., et al., *Plug-and-Display: decoration of Virus-Like Particles via isopeptide bonds for modular immunization*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 19234.
29. Palladini, A., et al., *Virus-like particle display of HER2 induces potent anti-cancer responses*. OncoImmunology, 2018. **7**(3): p. e1408749.
30. Barcena, J. and E. Blanco, *Design of novel vaccines based on virus-like particles or chimeric virions*. Subcell Biochem, 2013. **68**: p. 631-65.
31. Tan, M. and X. Jiang, *Subviral particle as vaccine and vaccine platform*. Current opinion in virology, 2014. **6**: p. 24-33.
32. Ruiz, V., Y. Durocher, and A. Wigdorovitz, *Advances in novel vaccines for foot and mouth disease: focus on recombinant empty capsids AU - Mignaqui, Ana Clara*. Critical Reviews in Biotechnology, 2019: p. 1-15.
33. Caldeira, J.C. and D.S. Peabody, *Thermal stability of RNA phage virus-like particles displaying foreign peptides*. Journal of nanobiotechnology, 2011. **9**: p. 22-22.
34. Chackerian, B., et al., *Peptide epitope identification by affinity selection on bacteriophage MS2 virus-like particles*. Journal of molecular biology, 2011. **409**(2): p. 225-237.
35. Peabody, D.S., et al., *Immunogenic display of diverse peptides on virus-like particles of RNA phage MS2*. Journal of molecular biology, 2008. **380**(1): p. 252-263.
36. Dong, Y.-m., et al., *Promising MS2 mediated virus-like particle vaccine against foot-and-mouth disease*. Antiviral Research, 2015. **117**: p. 39-43.
37. Wang, G., et al., *Immunogenicity evaluation of MS2 phage-mediated chimeric nanoparticle displaying an immunodominant B cell epitope of foot-and-mouth disease virus*. PeerJ, 2018. **6**: p. e4823.
38. Basu, R., et al., *Immunization with phage virus-like particles displaying Zika virus potential B-cell epitopes neutralizes Zika virus infection of monkey kidney cells*. Vaccine, 2018. **36**(10): p. 1256-1264.
39. Tumban, E., et al., *Preclinical refinements of a broadly protective VLP-based HPV vaccine targeting the minor capsid protein, L2*. Vaccine, 2015. **33**(29): p. 3346-3353.
40. Clarke, B.E., et al., *Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core protein*. Nature, 1987. **330**(6146): p. 381-4.
41. Whitacre, D.C., B.O. Lee, and D.R. Milich, *Use of hepadnavirus core proteins as vaccine platforms*. Expert review of vaccines, 2009. **8**(11): p. 1565-1573.
42. Roose, K., et al., *Hepatitis B core-based virus-like particles to present heterologous epitopes*. Expert Review of Vaccines, 2013. **12**(2): p. 183-198.

43. Ye, X., et al., *Chimeric virus-like particle vaccines displaying conserved enterovirus 71 epitopes elicit protective neutralizing antibodies in mice through divergent mechanisms*. Journal of virology, 2014. **88**(1): p. 72-81.
44. Skrastina, D., et al., *Chimeric derivatives of hepatitis B virus core particles carrying major epitopes of the rubella virus E1 glycoprotein*. Clinical and vaccine immunology : CVI, 2013. **20**(11): p. 1719-1728.
45. Arora, U., et al., *Virus-like particles displaying envelope domain III of dengue virus type 2 induce virus-specific antibody response in mice*. Vaccine, 2013. **31**(6): p. 873-878.
46. Dhanasooraj, D., R.A. Kumar, and S. Mundayoor, *Vaccine delivery system for tuberculosis based on nano-sized hepatitis B virus core protein particles*. International journal of nanomedicine, 2013. **8**: p. 835-843.
47. Wang, Y.-s., et al., *Virus-like particles of hepatitis B virus core protein containing five mimotopes of infectious bursal disease virus (IBDV) protect chickens against IBDV*. Vaccine, 2012. **30**(12): p. 2125-2130.
48. Chua, A.J.S., et al., *A novel platform for virus-like particle-display of flaviviral envelope domain III: induction of Dengue and West Nile virus neutralizing antibodies*. Virology journal, 2013. **10**: p. 129-129.
49. Schwarz, B., et al., *Viruslike Particles Encapsidating Respiratory Syncytial Virus M and M2 Proteins Induce Robust T Cell Responses*. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2016. **2**(12): p. 2324-2332.
50. Patterson, D.P., et al., *Biomimetic antigenic nanoparticles elicit controlled protective immune response to influenza*. ACS Nano, 2013. **7**(4): p. 3036-44.
51. Hassani-Mehraban, A., et al., *Feasibility of Cowpea chlorotic mottle virus-like particles as scaffold for epitope presentations*. BMC biotechnology, 2015. **15**: p. 80-80.
52. Manayani, D.J., et al., *A viral nanoparticle with dual function as an anthrax antitoxin and vaccine*. PLoS pathogens, 2007. **3**(10): p. 1422-1431.
53. Venter, P.A., et al., *Multivalent display of proteins on viral nanoparticles using molecular recognition and chemical ligation strategies*. Biomacromolecules, 2011. **12**(6): p. 2293-2301.
54. McGinnes, L.W., et al., *Assembly and immunological properties of Newcastle disease virus-like particles containing the respiratory syncytial virus F and G proteins*. Journal of virology, 2011. **85**(1): p. 366-377.
55. Morrison, T.G., *Newcastle disease virus-like particles as a platform for the development of vaccines for human and agricultural pathogens*. Future virology, 2010. **5**(5): p. 545-554.
56. Lv, L., et al., *Production and immunogenicity of chimeric virus-like particles containing the spike glycoprotein of infectious bronchitis virus*. Journal of veterinary science, 2014. **15**(2): p. 209-216.
57. Shen, H., et al., *Assembly and immunological properties of a bivalent virus-like particle (VLP) for avian influenza and Newcastle disease*. Virus Research, 2013. **178**(2): p. 430-436.
58. Quan, F.-S., et al., *Viruslike particle vaccine induces protection against respiratory syncytial virus infection in mice*. The Journal of infectious diseases, 2011. **204**(7): p. 987-995.
59. Thrane, S., et al., *A Novel Virus-Like Particle Based Vaccine Platform Displaying the Placental Malaria Antigen VAR2CSA*. PloS one, 2015. **10**(11): p. e0143071-e0143071.
60. Dalsgaard, K., et al., *Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease*. Nature Biotechnology, 1997. **15**(3): p. 248-252.
61. Brennan, F.R., et al., *Pseudomonas aeruginosa outer-membrane protein F epitopes are highly immunogenic in mice when expressed on a plant virus*. Microbiology, 1999. **145**(1): p. 211-220.
62. Jemon, K., et al., *An Enhanced Heterologous Virus-Like Particle for Human Papillomavirus Type 16 Tumour Immunotherapy*. PLOS ONE, 2013. **8**(6): p. e66866.

63. Crisci, E., et al., *Chimeric calicivirus-like particles elicit specific immune responses in pigs*. Vaccine, 2012. **30**(14): p. 2427-2439.
64. Moreno, N., et al., *Rabbit hemorrhagic disease virus capsid, a versatile platform for foreign B-cell epitope display inducing protective humoral immune responses*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 31844.
65. Nagesha, H.S., L.F. Wang, and A.D. Hyatt, *Virus-like particles of calicivirus as epitope carriers*. Arch Virol, 1999. **144**(12): p. 2429-39.
66. Kramer, K., et al., *Functionalisation of Virus-Like Particles Enhances Antitumour Immune Responses*. Vol. 2019. 2019. 1-10.
67. Peacey, M., et al., *Virus-like particles from rabbit hemorrhagic disease virus can induce an anti-tumor response*. Vaccine, 2008. **26**(42): p. 5334-7.
68. Li, K., et al., *Antigen incorporated in virus-like particles is delivered to specific dendritic cell subsets that induce an effective antitumor immune response in vivo*. J Immunother, 2013. **36**(1): p. 11-9.
69. Donaldson, B., et al., *Multi-target chimaeric VLP as a therapeutic vaccine in a model of colorectal cancer*. J Immunother Cancer, 2017. **5**(1): p. 69.
70. Kawano, M., et al., *Chimeric SV40 virus-like particles induce specific cytotoxicity and protective immunity against influenza A virus without the need of adjuvants*. Virology, 2014. **448**: p. 159-167.
71. Lee, C.-D., et al., *Production of FMDV Virus-like particle by a SUMO fusion protein approach in Escherichia coli*. Vol. 16. 2009. 69.
72. Felberbaum, R.S., *The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors*. Biotechnology Journal, 2015. **10**(5): p. 702-714.
73. Marsian, J. and G.P. Lomonosoff, *Molecular pharming—VLPs made in plants*. Current Opinion in Biotechnology, 2016. **37**: p. 201-206.
74. Ruiz, V., et al., *Minimally processed crude leaf extracts of Nicotiana benthamiana containing recombinant foot and mouth disease virus-like particles are immunogenic in mice*. Biotechnology Reports, 2018. **20**: p. e00283.
75. Cox, M.M.J., *Recombinant protein vaccines produced in insect cells*. Vaccine, 2012. **30**(10): p. 1759-1766.
76. López-Vidal, J., et al., *Improved Production Efficiency of Virus-Like Particles by the Baculovirus Expression Vector System*. PloS one, 2015. **10**(10): p. e0140039-e0140039.
77. Noad, R. and P. Roy, *Virus-like particles as immunogens*. Trends in Microbiology, 2003. **11**(9): p. 438-444.
78. Brun, A., et al., *Current strategies for subunit and genetic viral veterinary vaccine development*. Virus Res, 2011. **157**(1): p. 1-12.
79. Ohlinger, V.F., et al., *Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease*. J Virol, 1990. **64**(7): p. 3331-6.
80. Abrantes, J., et al., *Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review*. Vet Res, 2012. **43**: p. 12.
81. Thumfart, J.O. and G. Meyers, *Rabbit hemorrhagic disease virus: identification of a cleavage site in the viral polyprotein that is not processed by the known calicivirus protease*. Virology, 2002. **304**(2): p. 352-63.
82. Laurent, S., et al., *Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection*. J Virol, 1994. **68**(10): p. 6794-8.

83. Barcena, J., et al., *The coat protein of Rabbit hemorrhagic disease virus contains a molecular switch at the N-terminal region facing the inner surface of the capsid*. Virology, 2004. **322**(1): p. 118-34.
84. Luque, D., et al., *Epitope Insertion at the N-Terminal Molecular Switch of the Rabbit Hemorrhagic Disease Virus T=3 Capsid Protein Leads to Larger T=4 Capsids*. Journal of Virology, 2012. **86**(12): p. 6470.
85. Wang, X., et al., *Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography*. PLoS Pathog, 2013. **9**(1): p. e1003132.
86. Nagesha, H.S., et al., *Self-assembly, antigenicity, and immunogenicity of the rabbit haemorrhagic disease virus (Czechoslovakian strain V-351) capsid protein expressed in baculovirus*. Arch Virol, 1995. **140**(6): p. 1095-1108.
87. Plana-Duran, J., et al., *Oral immunization of rabbits with VP60 particles confers protection against rabbit hemorrhagic disease*. Arch Virol, 1996. **141**(8): p. 1423-36.
88. Pérez-Filgueira, D.M., et al., *Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV*. Virology, 2007. **364**(2): p. 422-430.
89. Crisci, E., et al., *Chimeric calicivirus-like particles elicit protective anti-viral cytotoxic responses without adjuvant*. Virology, 2009. **387**(2): p. 303-312.
90. El Mehdaoui, S., et al., *Gene transfer using recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsids with genetically modified DNA encapsidation capacity by addition of packaging sequences from the L1 or L2 protein of human papillomavirus type 16*. J Virol, 2000. **74**(22): p. 10332-40.
91. Alonso-Padilla, J., et al., *Development of Novel Adenoviral Vectors to Overcome Challenges Observed With HAdV-5-based Constructs*. Mol Ther, 2016. **24**(1): p. 6-16.
92. Lee, C.S., et al., *Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine*. Genes & Diseases, 2017. **4**(2): p. 43-63.
93. Afkhami, S., Y. Yao, and Z. Xing, *Methods and clinical development of adenovirus-vectored vaccines against mucosal pathogens*. Mol Ther Methods Clin Dev, 2016. **3**: p. 16030.
94. Rojas, J., N. Sevilla, and V. Martín, *Adenovirus as Tools in Animal Health*. 2018.
95. Tatsis, N. and H.C. Ertl, *Adenoviruses as vaccine vectors*. Mol Ther, 2004. **10**(4): p. 616-29.
96. Crystal, R.G., *Adenovirus: the first effective in vivo gene delivery vector*. Hum Gene Ther, 2014. **25**(1): p. 3-11.
97. Ferreira, T.B., et al., *Use of adenoviral vectors as veterinary vaccines*. Gene Ther, 2005. **12 Suppl 1**: p. S73-83.
98. Ramezanzpour, B., et al., *Vector-based genetically modified vaccines: Exploiting Jenner's legacy*. Vaccine, 2016. **34**(50): p. 6436-6448.
99. Baron, M.D., M. Iqbal, and V. Nair, *Recent advances in viral vectors in veterinary vaccinology*. Current Opinion in Virology, 2018. **29**: p. 1-7.
100. De Vleeschauwer, A.R., et al., *A canine adenovirus type 2 vaccine vector confers protection against foot-and-mouth disease in guinea pigs*. Vaccine, 2018. **36**(16): p. 2193-2198.
101. Xiang, Z.Q., et al., *Protection of non-human primates against rabies with an adenovirus recombinant vaccine*. Virology, 2014. **450-451**: p. 243-249.
102. Warimwe, G.M., et al., *Chimpanzee Adenovirus Vaccine Provides Multispecies Protection against Rift Valley Fever*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 20617.
103. Grubman, M., et al., *Use of replication-defective adenoviruses to develop vaccines and biotherapeutics against foot-and-mouth disease*. Vol. 7. 2012. 767-778.
104. Cox, S.J. and P.V. Barnett, *Experimental evaluation of foot-and-mouth disease vaccines for emergency use in ruminants and pigs: a review*. Vet Res, 2009. **40**(3): p. 13.

105. Knight-Jones, T.J.D. and J. Rushton, *The economic impacts of foot and mouth disease – What are they, how big are they and where do they occur?* Preventive Veterinary Medicine, 2013. **112**(3): p. 161-173.
106. Bachrach, H.L., *Foot-And-Mouth Disease*. Annual Review of Microbiology, 1968. **22**(1): p. 201-244.
107. Forman, A.J., et al., *Studies with foot-and-mouth disease virus in British deer (red, fallow and roe): II. Recovery of virus and serological response*. Journal of Comparative Pathology, 1974. **84**(2): p. 221-229.
108. Alexandersen, S., et al., *Studies of Quantitative Parameters of Virus Excretion and Transmission in Pigs and Cattle Experimentally Infected with Foot-and-Mouth Disease Virus*. Journal of Comparative Pathology, 2003. **129**(4): p. 268-282.
109. Stenfeldt, C., et al., *The Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease in Pigs*. Frontiers in Veterinary Science, 2016. **3**(41).
110. Yamada, M., et al., *Early pathogenesis of the foot-and-mouth disease virus O/JPN/2010 in experimentally infected pigs*. J Vet Med Sci, 2018. **80**(4): p. 689-700.
111. Alexandersen, S. and A.I. Donaldson, *Further studies to quantify the dose of natural aerosols of foot-and-mouth disease virus for pigs*. Epidemiol Infect, 2002. **128**(2): p. 313-23.
112. Arzt, J., et al., *Transmission of Foot-and-Mouth Disease from Persistently Infected Carrier Cattle to Naive Cattle via Transfer of Oropharyngeal Fluid*. mSphere, 2018. **3**(5): p. e00365-18.
113. Stenfeldt, C., et al., *The Foot-and-Mouth Disease Carrier State Divergence in Cattle*. Journal of Virology, 2016. **90**(14): p. 6344.
114. Doel, T.R., *FMD vaccines*. Virus Res, 2003. **91**(1): p. 81-99.
115. Woolhouse, M.E., *Foot-and-mouth disease in the UK: what should we do next time?* J Appl Microbiol, 2003. **94 Suppl**: p. 126s-130s.
116. Rojas, H. and J.R. Romero, *Where to next with animal health in Latin America? The transition from endemic to disease-free status*. Rev Sci Tech, 2017. **36**(1): p. 331-348.
117. Gallagher, E., et al., *Estimating the risk of importation of foot-and-mouth disease into Europe*. Vet Rec, 2002. **150**(25): p. 769-72.
118. Mort, M., et al., *Psychosocial effects of the 2001 UK foot and mouth disease epidemic in a rural population: qualitative diary based study*. Bmj, 2005. **331**(7527): p. 1234.
119. Rott, R. and S. Siddell, *One hundred years of animal virology*. J Gen Virol, 1998. **79 (Pt 11)**: p. 2871-4.
120. Belsham, G.J., *Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure*. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 1993. **60**(3): p. 241-260.
121. Sobrino, F. and E. Domingo, *Foot and mouth disease virus: current research and emerging trends*. 2017.
122. Yuan, H., et al., *The pH stability of foot-and-mouth disease virus*. Virology journal, 2017. **14**(1): p. 233-233.
123. Martínez-Salas, E., et al., *IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity*. Biochimie, 2002. **84**(8): p. 755-763.
124. Grubman, M.J., et al., *Evading the host immune response: how foot-and-mouth disease virus has become an effective pathogen*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2008. **53**(1): p. 8-17.
125. Rodríguez Pulido, M. and M. Sáiz, *Molecular Mechanisms of Foot-and-Mouth Disease Virus Targeting the Host Antiviral Response*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017. **7**(252).
126. Domingo, E., et al., *Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population*. Cell, 1978. **13**(4): p. 735-744.

127. Domingo, E., J. Sheldon, and C. Perales, *Viral quasispecies evolution*. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 2012. **76**(2): p. 159-216.
128. Knowles, N.J. and A.R. Samuel, *Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus*. Virus Res, 2003. **91**(1): p. 65-80.
129. Jamal, S.M. and G.J. Belsham, *Foot-and-mouth disease: past, present and future*. Veterinary Research, 2013. **44**(1): p. 116.
130. Mahapatra, M., et al., *Selection of vaccine strains for serotype O foot-and-mouth disease viruses (2007–2012) circulating in Southeast Asia, East Asia and Far East*. Vaccine, 2017. **35**(51): p. 7147-7153.
131. Sanchez-Trincado, J.L., M. Gomez-Perosanz, and P.A. Reche, *Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction*. Journal of immunology research, 2017. **2017**: p. 2680160-2680160.
132. Paton, D.J., K.J. Sumption, and B. Charleston, *Options for control of foot-and-mouth disease: knowledge, capability and policy*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2009. **364**(1530): p. 2657-67.
133. Doel, T.R., et al., *Heterotypic protection induced by synthetic peptides corresponding to three serotypes of foot-and-mouth disease virus*. J Virol, 1990. **64**(5): p. 2260-4.
134. Rodriguez, L.L., et al., *A synthetic peptide containing the consensus sequence of the G-H loop region of foot-and-mouth disease virus type-O VP1 and a promiscuous T-helper epitope induces peptide-specific antibodies but fails to protect cattle against viral challenge*. Vaccine, 2003. **21**(25-26): p. 3751-6.
135. Kitson, J.D., et al., *Chimeric polioviruses that include sequences derived from two independent antigenic sites of foot-and-mouth disease virus (FMDV) induce neutralizing antibodies against FMDV in guinea pigs*. J Virol, 1991. **65**(6): p. 3068-75.
136. Gao, Y., S.Q. Sun, and H.C. Guo, *Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements*. Virol J, 2016. **13**: p. 107.
137. Han, S.C., H.C. Guo, and S.Q. Sun, *Three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus and its biological functions*. Arch Virol, 2015. **160**(1): p. 1-16.
138. Grazioli, S., F. Fallacara, and E. Brocchi, *Mapping of antigenic sites of foot-and-mouth disease virus serotype Asia 1 and relationships with sites described in other serotypes*. J Gen Virol, 2013. **94**(Pt 3): p. 559-69.
139. Parida, S., *Foot and mouth disease vaccine strain selection: current approaches and future perspectives AU - Mahapatra, Mana*. Expert Review of Vaccines, 2018. **17**(7): p. 577-591.
140. Mahapatra, M., P. Hamblin, and D.J. Paton, *Foot-and-mouth disease virus epitope dominance in the antibody response of vaccinated animals*. J Gen Virol, 2012. **93**(Pt 3): p. 488-93.
141. Asfor, A.S., et al., *Novel antibody binding determinants on the capsid surface of serotype O foot-and-mouth disease virus*. J Gen Virol, 2014. **95**(Pt 5): p. 1104-16.
142. Usherwood, E.J. and A.A. Nash, *Lymphocyte recognition of picornaviruses*. Journal of General Virology, 1995. **76**(3): p. 499-508.
143. Robinson, L., et al., *Global Foot-and-Mouth Disease Research Update and Gap Analysis: 6 - Immunology*. Transbound Emerg Dis, 2016. **63 Suppl 1**: p. 56-62.
144. Carr, B.V., et al., *CD4+ T-cell responses to foot-and-mouth disease virus in vaccinated cattle*. J Gen Virol, 2013. **94**(Pt 1): p. 97-107.
145. Guzman, E., et al., *An MHC-restricted CD8+ T-cell response is induced in cattle by foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection and also following vaccination with inactivated FMDV*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 3): p. 667-75.
146. Patch, J.R., et al., *Characterization of cytotoxic T lymphocyte function after foot-and-mouth disease virus infection and vaccination*. Viral Immunol, 2013. **26**(4): p. 239-49.

147. Collen, T., R. Dimarchi, and T.R. Doel, *A T cell epitope in VP1 of foot-and-mouth disease virus is immunodominant for vaccinated cattle*. The Journal of Immunology, 1991. **146**(2): p. 749.
148. Blanco, E., et al., *Identification of T-cell epitopes in nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus*. J Virol, 2001. **75**(7): p. 3164-74.
149. Garcia-Briones, M.M., et al., *Immunogenicity and T cell recognition in swine of foot-and-mouth disease virus polymerase 3D*. Virology, 2004. **322**(2): p. 264-75.
150. Abbas, A.K., et al., *Activation and functions of CD4+ T-cell subsets*. Immunol Rev, 1991. **123**: p. 5-22.
151. Rodriguez, A., et al., *Antigenic specificity of porcine T cell response against foot-and-mouth disease virus structural proteins: identification of T helper epitopes in VP1*. Virology, 1994. **205**(1): p. 24-33.
152. Gerner, W., et al., *Identification of a novel foot-and-mouth disease virus specific T-cell epitope with immunodominant characteristics in cattle with MHC serotype A31*. Vet. Res., 2007. **38**(4): p. 565-572.
153. Blanco, E., et al., *Interspecies major histocompatibility complex-restricted Th cell epitope on foot-and-mouth disease virus capsid protein VP4*. J Virol, 2000. **74**(10): p. 4902-7.
154. Gerner, W., et al., *Identification of Major Histocompatibility Complex Restriction and Anchor Residues of Foot-and-Mouth Disease Virus-Derived Bovine T-Cell Epitopes*. Journal of Virology, 2009. **83**(9): p. 4039.
155. Collen, T., et al., *Heterotypic recognition of recombinant FMDV proteins by bovine T-cells: the polymerase (P3Dpol) as an immunodominant T-cell immunogen*. Virus Res, 1998. **56**(2): p. 125-33.
156. Gerner, W., et al., *Identification of novel foot-and-mouth disease virus specific T-cell epitopes in c/c and d/d haplotype miniature swine*. Virus Res, 2006. **121**(2): p. 223-8.
157. Cedillo-Barrón, L., et al., *Induction of a protective response in swine vaccinated with DNA encoding foot-and-mouth disease virus empty capsid proteins and the 3D RNA polymerase*. Journal of General Virology, 2001. **82**(7): p. 1713-1724.
158. Barfoed, A.M., et al., *DNA immunization with 2C FMDV non-structural protein reveals the presence of an immunodominant CD8+, CTL epitope for Balb/c mice*. Antiviral Res, 2006. **72**(3): p. 178-89.
159. Gao, F.-S., et al., *Identification of two novel foot-and-mouth disease virus cytotoxic T lymphocyte epitopes that can bind six SLA-I proteins*. Gene, 2018. **653**: p. 91-101.
160. Guzman, E., et al., *Induction of a cross-reactive CD8(+) T cell response following foot-and-mouth disease virus vaccination*. J Virol, 2010. **84**(23): p. 12375-84.
161. Luciani, F., *High-throughput sequencing and vaccine design*. Rev Sci Tech, 2016. **35**(1): p. 53-65.
162. Pedersen, L.E., et al., *Identification of peptides from foot-and-mouth disease virus structural proteins bound by class I swine leukocyte antigen (SLA) alleles, SLA-1*0401 and SLA-2*0401*. Animal Genetics, 2013. **44**(3): p. 251-258.
163. Charleston, B. and S.P. Graham, *Recent advances in veterinary applications of structural vaccinology*. Current Opinion in Virology, 2018. **29**: p. 33-38.
164. Brito, B.P., et al., *Review of the Global Distribution of Foot-and-Mouth Disease Virus from 2007 to 2014*. Transbound Emerg Dis, 2017. **64**(2): p. 316-332.
165. Mahapatra, M., et al., *Antigenic and genetic comparison of foot-and-mouth disease virus serotype O Indian vaccine strain, O/IND/R2/75 against currently circulating viruses*. Vaccine, 2015. **33**(5): p. 693-700.
166. Paton, D.J., S. Gubbins, and D.P. King, *Understanding the transmission of foot-and-mouth disease virus at different scales*. Current Opinion in Virology, 2018. **28**: p. 85-91.

167. Jamal, S.M. and G.J. Belsham, *Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of foot-and-mouth disease virus*. Infection, Genetics and Evolution, 2018. **59**: p. 84-98.
168. Cao, Y., *Adjuvants for foot-and-mouth disease virus vaccines: recent progress AU - Cao, Yimei*. Expert Review of Vaccines, 2014. **13**(11): p. 1377-1385.
169. de los Santos, T., F. Diaz-San Segundo, and L.L. Rodriguez, *The need for improved vaccines against foot-and-mouth disease*. Current Opinion in Virology, 2018. **29**: p. 16-25.
170. Robinson, L., et al., *Global Foot-and-Mouth Disease Research Update and Gap Analysis: 3 - Vaccines*. Transbound Emerg Dis, 2016. **63 Suppl 1**: p. 30-41.
171. Dar, P., et al., *Montanide ISA™ 201 adjuvanted FMD vaccine induces improved immune responses and protection in cattle*. Vaccine, 2013. **31**(33): p. 3327-3332.
172. Lyons, N.A., et al., *Evaluation of a polyvalent foot-and-mouth disease virus vaccine containing A Saudi-95 against field challenge on large-scale dairy farms in Saudi Arabia with the emerging A/ASIA/G-VII viral lineage*. Vaccine, 2017. **35**(49 Pt B): p. 6850-6857.
173. Waters, R., et al., *Efficacy of a high-potency multivalent foot-and-mouth disease virus vaccine in cattle against heterologous challenge with a field virus from the emerging A/ASIA/G-VII lineage*. Vaccine, 2018. **36**(14): p. 1901-1907.
174. Je, S.H., et al., *Genetic identification and serological evaluation of commercial inactivated foot-and-mouth disease virus vaccine in pigs*. Clinical and experimental vaccine research, 2018. **7**(2): p. 139-144.
175. Lyons, N.A., et al., *Challenges of Generating and Maintaining Protective Vaccine-Induced Immune Responses for Foot-and-Mouth Disease Virus in Pigs*. Frontiers in veterinary science, 2016. **3**: p. 102-102.
176. Heininger, U., et al., *The concept of vaccination failure*. Vaccine, 2012. **30**(7): p. 1265-1268.
177. Cottam, E.M., et al., *Transmission pathways of foot-and-mouth disease virus in the United Kingdom in 2007*. PLoS pathogens, 2008. **4**(4): p. e1000050-e1000050.
178. Parida, S., *Vaccination against foot-and-mouth disease virus: strategies and effectiveness*. Expert Rev Vaccines, 2009. **8**(3): p. 347-65.
179. Rincón, V., et al., *Identification of the Structural Basis of Thermal Lability of a Virus Provides a Rationale for Improved Vaccines*. Structure, 2014. **22**(11): p. 1560-1570.
180. Cartwright, B., W.G. Chapman, and F. Brown, *Serological and Immunological Relationships between the 146S and 12S Particles of Foot-and-Mouth Disease Virus*. Journal of General Virology, 1980. **50**(2): p. 369-375.
181. Rodriguez, L.L. and M.J. Grubman, *Foot and mouth disease virus vaccines*. Vaccine, 2009. **27**: p. D90-D94.
182. Knight-Jones, T.J., et al., *Global Foot-and-Mouth Disease Research Update and Gap Analysis: 1 - Overview of Global Status and Research Needs*. Transbound Emerg Dis, 2016. **63 Suppl 1**: p. 3-13.
183. Uddowla, S., et al., *A Safe Foot-and-Mouth Disease Vaccine Platform with Two Negative Markers for Differentiating Infected from Vaccinated Animals*. Journal of Virology, 2012. **86**(21): p. 11675.
184. Rodriguez-Calvo, T., et al., *New vaccine design based on defective genomes that combines features of attenuated and inactivated vaccines*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10414.
185. Rai, D.K., et al., *Attenuation of Foot-and-Mouth Disease Virus by Engineered Viral Polymerase Fidelity*. Journal of virology, 2017. **91**(15): p. e00081-17.
186. Sanz-Parra, A., et al., *Analysis of the B and T cell response in guinea pigs induced with recombinant vaccinia expressing foot-and-mouth disease virus structural proteins*. Arch Virol, 1998. **143**(2): p. 389-98.

187. Ma, M., et al., *Immune responses of swine inoculated with a recombinant fowlpox virus co-expressing P12A and 3C of FMDV and swine IL-18*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2008. **121**(1): p. 1-7.
188. Gullberg, M., et al., *Correction: A Prime-Boost Vaccination Strategy in Cattle to Prevent Foot-and-Mouth Disease Using a "Single-Cycle" Alphavirus Vector and Empty Capsid Particles*. PLoS One, 2017. **12**(3): p. e0173327.
189. Moraes, M.P., et al., *Early protection against homologous challenge after a single dose of replication-defective human adenovirus type 5 expressing capsid proteins of foot-and-mouth disease virus (FMDV) strain A24*. Vaccine, 2002. **20**(11-12): p. 1631-9.
190. Moraes, M.P., et al., *Increased efficacy of an adenovirus-vectored foot-and-mouth disease capsid subunit vaccine expressing nonstructural protein 2B is associated with a specific T cell response*. Vaccine, 2011. **29**(51): p. 9431-9440.
191. Pacheco, J.M., et al., *Rapid protection of cattle from direct challenge with foot-and-mouth disease virus (FMDV) by a single inoculation with an adenovirus-vectored FMDV subunit vaccine*. Virology, 2005. **337**(2): p. 205-9.
192. Pena, L., et al., *Delivery of a foot-and-mouth disease virus empty capsid subunit antigen with nonstructural protein 2B improves protection of swine*. Vaccine, 2008. **26**(45): p. 5689-5699.
193. Schutta, C., et al., *Multiple efficacy studies of an adenovirus-vectored foot-and-mouth disease virus serotype A24 subunit vaccine in cattle using homologous challenge*. Vaccine, 2016. **34**(27): p. 3214-3220.
194. Barrera, J., et al., *Use of ENABL® adjuvant to increase the potency of an adenovirus-vectored foot-and-mouth disease virus serotype A subunit vaccine*. Vaccine, 2018. **36**(8): p. 1078-1084.
195. Fernandez-Sainz, I., et al., *Adenovirus-vectored foot-and-mouth disease vaccine confers early and full protection against FMDV O1 Manisa in swine*. Virology, 2017. **502**: p. 123-132.
196. Barrera, J., et al., *Versatility of the adenovirus-vectored foot-and-mouth disease vaccine platform across multiple foot-and-mouth disease virus serotypes and topotypes using a vaccine dose representative of the AdtA24 conditionally licensed vaccine*. Vaccine, 2018. **36**(48): p. 7345-7352.
197. Diaz-San Segundo, F., et al., *Poly ICLC increases the potency of a replication-defective human adenovirus vectored foot-and-mouth disease vaccine*. Virology, 2014. **468-470**: p. 283-292.
198. Diaz-San Segundo, F., et al., *Combination of Adt-O1Manisa and Ad5-bolFNlambda3 induces early protective immunity against foot-and-mouth disease in cattle*. Virology, 2016. **499**: p. 340-349.
199. Yin, C., et al., *Induction of protective immune response against both PPRV and FMDV by a novel recombinant PPRV expressing FMDV VP1*. Vet Res, 2014. **45**: p. 62.
200. Kotecha, A., et al., *Structure-based energetics of protein interfaces guides foot-and-mouth disease virus vaccine design*. Nat Struct Mol Biol, 2015. **22**(10): p. 788-94.
201. Porta, C., et al., *Efficient production of foot-and-mouth disease virus empty capsids in insect cells following down regulation of 3C protease activity*. Journal of virological methods, 2013. **187**(2): p. 406-412.
202. Martínez-Salas, E. and E. Domingo, *Effect of Expression of the Aphthovirus Protease 3C on Viral Infection and Gene Expression*. Virology, 1995. **212**(1): p. 111-120.
203. Puckette, M., et al., *Foot-and-Mouth Disease (FMD) Virus 3C Protease Mutant L127P: Implications for FMD Vaccine Development*. Journal of virology, 2017. **91**(22): p. e00924-17.
204. Puckette, M., et al., *Production of foot-and-mouth disease virus capsid proteins by the TEV protease*. Journal of Biotechnology, 2018. **275**: p. 7-12.
205. Curry, S., et al., *Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus*. Journal of virology, 1997. **71**(12): p. 9743-9752.

206. Caridi, F., et al., *Preserved immunogenicity of an inactivated vaccine based on foot-and-mouth disease virus particles with improved stability*. Veterinary Microbiology, 2017. **203**: p. 275-279.
207. Vázquez-Calvo, A., et al., *An increase in acid resistance of foot-and-mouth disease virus capsid is mediated by a tyrosine replacement of the VP2 histidine previously associated with VP0 cleavage*. Journal of virology, 2014. **88**(5): p. 3039-3042.
208. Cubillos, C., et al., *Enhanced mucosal immunoglobulin A response and solid protection against foot-and-mouth disease virus challenge induced by a novel dendrimeric peptide*. J Virol, 2008. **82**(14): p. 7223-30.
209. Cubillos, C., et al., *Inclusion of a specific T cell epitope increases the protection conferred against foot-and-mouth disease virus in pigs by a linear peptide containing an immunodominant B cell site*. Virol J, 2012. **9**: p. 66.
210. Blanco, E., et al., *B Epitope Multiplicity and B/T Epitope Orientation Influence Immunogenicity of Foot-and-Mouth Disease Peptide Vaccines* %J Clinical and Developmental Immunology. 2013. **2013**: p. 9.
211. Blanco, E., et al., *Full protection of swine against foot-and-mouth disease by a bivalent B-cell epitope dendrimer peptide*. Antiviral Research, 2016. **129**: p. 74-80.
212. Cao, Y., et al., *Poly(I:C) combined with multi-epitope protein vaccine completely protects against virulent foot-and-mouth disease virus challenge in pigs*. Antiviral Research, 2013. **97**(2): p. 145-153.
213. Borrego, B., et al., *Combined administration of synthetic RNA and a conventional vaccine improves immune responses and protection against foot-and-mouth disease virus in swine*. Antiviral Research, 2017. **142**: p. 30-36.
214. Rodríguez-Pulido, M., et al., *RNA structural domains in noncoding regions of the foot-and-mouth disease virus genome trigger innate immunity in porcine cells and mice*. Journal of virology, 2011. **85**(13): p. 6492-6501.
215. Borrego, B., et al., *Delivery of synthetic RNA can enhance the immunogenicity of vaccines against foot-and-mouth disease virus (FMDV) in mice*. Vaccine, 2013. **31**(40): p. 4375-4381.
216. Rodríguez Pulido, M., et al., *Synthetic RNA derived from the foot-and-mouth disease virus genome elicits antiviral responses in bovine and porcine cells through IRF3 activation*. Veterinary Microbiology, 2018. **221**: p. 8-12.
217. Mason, P.W., et al., *Comparisons of the complete genomes of Asian, African and European isolates of a recent foot-and-mouth disease virus type O pandemic strain (PanAsia)*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 6): p. 1583-93.
218. Carrillo, C., et al., *Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus*. Journal of virology, 2005. **79**(10): p. 6487-6504.
219. Toja, M., C. Escarmis, and E. Domingo, *Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection*. Virus Res, 1999. **64**(2): p. 161-71.
220. Ferrer-Orta, C., et al., *Multifunctionality of a Picornavirus Polymerase Domain: Nuclear Localization Signal and Nucleotide Recognition*. Journal of Virology, 2015. **89**(13): p. 6848.
221. Robert R. Granados, L.G., Anja C.G. Derksen, Kevin A. McKenna, *A new insect cell line from Trichoplusia ni (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to Trichoplusia ni single enveloped nuclear polyhedrosis virus*, . Journal of Invertebrate Pathology, 1994. **Volume 64**(Issue 3): p. Pages 260-266.
222. Giral, M. and E. Diaz de Rada, *[Bone-marrow biopsy in the diagnosis of acute leukaemia (author's transl)]*. Sangre (Barc), 1981. **26**(5-c): p. 982-91.

223. Ferrer-Orta C1, A.A., Perez-Luque R, Escarmis C, Domingo E, Verdaguer N., *Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA*. The Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(45): p. 47212-47221.
224. Mateu, M.G., et al., *A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C*. J Gen Virol, 1990. **71** (Pt 3): p. 629-37.
225. Armando Arias, R.A., Cristina Ferrer-Orta, Rosa Pérez-Luque, Antero Airaksinen, Emiliana Brocchi, Esteban Domingo, Nuria Verdaguer, Cristina Escarmis, *Mutant Viral Polymerase in the Transition of Virus to Error Catastrophe Identifies a Critical Site for RNA Binding*. Journal of Molecular Biology, 2005. **353**(5): p. 1021-1032.
226. REED, L.J. and H. MUENCH, *A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS*. American Journal of Epidemiology, 1938. **27**(3): p. 493-497.
227. Maniatis, T., E. F Fritsch, and J. Sambrook, *Molecular cloning : a laboratory manual / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis*. 2019.
228. Condezo, G.N., et al., *Structures of Adenovirus Incomplete Particles Clarify Capsid Architecture and Show Maturation Changes of Packaging Protein L1 52/55k*. Journal of Virology, 2015. **89**(18): p. 9653.
229. Beljanski, V., et al., *Enhanced Influenza Virus-Like Particle Vaccination with a Structurally Optimized RIG-I Agonist as Adjuvant*. Journal of Virology, 2015. **89**(20): p. 10612.
230. Chiang, C., et al., *Sequence-Specific Modifications Enhance the Broad-Spectrum Antiviral Response Activated by RIG-I Agonists*. Journal of Virology, 2015. **89**(15): p. 8011.
231. Salguero, F.J., et al., *Foot-and-mouth disease virus (FMDV) causes an acute disease that can be lethal for adult laboratory mice*. Virology, 2005. **332**(1): p. 384-96.
232. Tildesley, M.J., et al., *The role of pre-emptive culling in the control of foot-and-mouth disease*. Proc Biol Sci, 2009. **276**(1671): p. 3239-48.
233. Leforban, Y., *How predictable were the outbreaks of foot and mouth disease in Europe in 2001 and is vaccination the answer?* Rev Sci Tech, 2002. **21**(3): p. 549-56, 539-47.
234. Pacheco, J.M., et al., *Persistent Foot-and-Mouth Disease Virus Infection in the Nasopharynx of Cattle; Tissue-Specific Distribution and Local Cytokine Expression*. PLOS ONE, 2015. **10**(5): p. e0125698.
235. Ludwig, C. and R. Wagner, *Virus-like particles—universal molecular toolboxes*. Current Opinion in Biotechnology, 2007. **18**(6): p. 537-545.
236. Lua, L.H., et al., *Bioengineering virus-like particles as vaccines*. Biotechnol Bioeng, 2014. **111**(3): p. 425-40.
237. Morrison, T.G., *Meeting report VLPNPV: Session 3: Immune responses*. Human vaccines & immunotherapeutics, 2014. **10**(10): p. 3064-3067.
238. Usha, R., et al., *Expression of an Animal Virus Antigenic Site on the Surface of a Plant Virus Particle*. Virology, 1993. **197**(1): p. 366-374.
239. Wigdorovitz, A., et al., *Protection of Mice against Challenge with Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) by Immunization with Foliar Extracts from Plants Infected with Recombinant Tobacco Mosaic Virus Expressing the FMDV Structural Protein VP1*. Virology, 1999. **264**(1): p. 85-91.
240. Wu, L., et al., *Expression of foot-and-mouth disease virus epitopes in tobacco by a tobacco mosaic virus-based vector*. Vaccine, 2003. **21**(27-30): p. 4390-4398.
241. Yang, C.-D., et al., *Induction of protective immunity in swine by recombinant bamboo mosaic virus expressing foot-and-mouth disease virus epitopes*. BMC biotechnology, 2007. **7**: p. 62-62.
242. Hema, M., et al., *Chimeric tymovirus-like particles displaying foot-and-mouth disease virus non-structural protein epitopes and its use for detection of FMDV-NSP antibodies*. Vaccine, 2007. **25**(25): p. 4784-4794.

243. Rémond, M., et al., *Infectious bursal disease subviral particles displaying the foot-and-mouth disease virus major antigenic site*. Vaccine, 2009. **27**(1): p. 93-98.
244. Pan, Q., et al., *Immunogenicity of adenovirus-derived porcine parvovirus-like particles displaying B and T cell epitopes of foot-and-mouth disease*. Vaccine, 2016. **34**(4): p. 578-585.
245. Chang, J., et al., *Potent neutralization activity against type O foot-and-mouth disease virus elicited by a conserved type O neutralizing epitope displayed on bovine parvovirus virus-like particles*. J Gen Virol, 2019. **100**(2): p. 187-198.
246. Zhang, Y.-L., et al., *Enhanced Immunogenicity of Modified Hepatitis B Virus Core Particle Fused with Multiepitopes of Foot-and-Mouth Disease Virus*. Scandinavian Journal of Immunology, 2007. **65**(4): p. 320-328.
247. Xu, H., et al., *Immunogenicity of T7 bacteriophage nanoparticles displaying G-H loop of foot-and-mouth disease virus (FMDV)*. Veterinary Microbiology, 2017. **205**: p. 46-52.
248. Ren, Z.J., et al., *Orally delivered foot-and-mouth disease virus capsid protomer vaccine displayed on T4 bacteriophage surface: 100% protection from potency challenge in mice*. Vaccine, 2008. **26**(11): p. 1471-1481.
249. Kong, D., et al., *Production, Characterization, and Epitope Mapping of Monoclonal Antibodies Against Different Subtypes of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV)*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 20857.
250. Capucci, L., et al., *Antigenicity of the Rabbit Hemorrhagic Disease Virus studied by its reactivity with monoclonal antibodies*. Vol. 37. 1995. 221-238.
251. Rueda, P., et al., *Minor Displacements in the Insertion Site Provoke Major Differences in the Induction of Antibody Responses by Chimeric Parvovirus-like Particles*. Virology, 1999. **263**(1): p. 89-99.
252. Sadeyen, J.-R.é., et al., *Insertion of a foreign sequence on capsid surface loops of human papillomavirus type 16 virus-like particles reduces their capacity to induce neutralizing antibodies and delineates a conformational neutralizing epitope*. Virology, 2003. **309**(1): p. 32-40.
253. Chackerian, B., D. R. Lowy, and J. T. Schiller, *Induction of autoantibodies to mouse CCR5 with recombinant papillomavirus particles*. Vol. 96. 1999. 2373-8.
254. Chackerian, B., D.R. Lowy, and J.T. Schiller, *Conjugation of a self-antigen to papillomavirus-like particles allows for efficient induction of protective autoantibodies*. The Journal of clinical investigation, 2001. **108**(3): p. 415-423.
255. Kratz, P.A., B. Böttcher, and M. Nassal, *Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(5): p. 1915-1920.
256. Crawley, A., C. Raymond, and B.N. Wilkie, *Control of immunoglobulin isotype production by porcine B-cells cultured with cytokines*. Vet Immunol Immunopathol, 2003. **91**(2): p. 141-54.
257. Crawley, A. and B.N. Wilkie, *Porcine Ig isotypes: function and molecular characteristics*. Vaccine, 2003. **21**(21-22): p. 2911-22.
258. Mulcahy, G., et al., *Isotype responses of infected, virus-vaccinated and peptide-vaccinated cattle to foot-and-mouth disease virus*. Vaccine, 1990. **8**(3): p. 249-56.
259. Pega, J., et al., *Systemic Foot-and-Mouth Disease Vaccination in Cattle Promotes Specific Antibody-Secreting Cells at the Respiratory Tract and Triggers Local Anamnestic Responses upon Aerosol Infection*. Journal of Virology, 2015. **89**(18): p. 9581.
260. Grant, C.F., et al., *The B-cell response to foot-and-mouth-disease virus in cattle following vaccination and live-virus challenge*. J Gen Virol, 2016. **97**(9): p. 2201-9.
261. Finkelman, F.D., et al., *Lymphokine Control of In Vivo Immunoglobulin Isotype Selection*. Annual Review of Immunology, 1990. **8**(1): p. 303-333.

262. Pérez Filgueira, D.M., et al., *Isotype profiles induced in Balb/c mice during foot and mouth disease (FMD) virus infection or immunization with different FMD vaccine formulations*. Vaccine, 1995. **13**(10): p. 953-960.
263. McCullough, K.C., et al., *Relationship between the anti-FMD virus antibody reaction as measured by different assays, and protection in vivo against challenge infection*. Veterinary Microbiology, 1992. **30**(2): p. 99-112.
264. Piatti, P.G., et al., *Comparison of the immune response elicited by infectious and inactivated foot-and-mouth disease virus in mice*. 1991. **72**(7): p. 1691-1694.
265. Juleff, N., et al., *Foot-and-mouth disease virus can induce a specific and rapid CD4⁺ T-cell-independent neutralizing and isotype class-switched antibody response in naive cattle*. J Virol, 2009. **83**(8): p. 3626-36.
266. Francis, M.J., et al., *Non-responsiveness to a foot-and-mouth disease virus peptide overcome by addition of foreign helper T-cell determinants*. Nature, 1987. **330**(6144): p. 168-70.
267. Boisgérault, F., et al., *Cross-Priming of T Cell Responses by Synthetic Microspheres Carrying a CD8⁺ T Cell Epitope Requires an Adjuvant Signal*. The Journal of Immunology, 2005. **174**(6): p. 3432.
268. Saalmuller, A., et al., *Characterization of porcine T lymphocytes and their immune response against viral antigens*. J Biotechnol, 1999. **73**(2-3): p. 223-33.
269. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1557-1569.
270. Rueda, P., et al., *Influence of flanking sequences on presentation efficiency of a CD8⁺ cytotoxic T-cell epitope delivered by parvovirus-like particles*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 3): p. 563-72.
271. Wang, C.Y., et al., *Effective synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease in swine*. Vaccine, 2002. **20**(19-20): p. 2603-10.
272. Li, X., et al., *Induction of protective immunity in swine by immunization with live attenuated recombinant pseudorabies virus expressing the capsid precursor encoding regions of foot-and-mouth disease virus*. Vaccine, 2008. **26**(22): p. 2714-2722.
273. Guo, H., et al., *Foot-and-mouth disease virus-like particles produced by a SUMO fusion protein system in Escherichia coli induce potent protective immune responses in guinea pigs, swine and cattle*. Vol. 44. 2013. 48.
274. McCullough, K., M. Sáiz, and A. Summerfield, *Innate to Adaptive: Immune Defence Handling of Foot-and-mouth Disease Virus*. 2017. p. 211-274.
275. Steward, M.W., et al., *High-affinity antibody induced by immunization with a synthetic peptide is associated with protection of cattle against foot-and-mouth disease*. Immunology, 1991. **72**(1): p. 99-103.
276. McCullough, K.C., et al., *Protective immune response against foot-and-mouth disease*. Journal of virology, 1992. **66**(4): p. 1835-1840.
277. Lannes, N., S. Python, and A. Summerfield, *Interplay of foot-and-mouth disease virus, antibodies and plasmacytoid dendritic cells: virus opsonization under non-neutralizing conditions results in enhanced interferon-alpha responses*. Veterinary research, 2012. **43**(1): p. 64-64.
278. McCullough, K. and F. Sobrino, *Immunology of Foot-and-Mouth Disease*. 2004. p. 175-222.
279. Eble, P.L., et al., *Comparison of immune responses after intra-typic heterologous and homologous vaccination against foot-and-mouth disease virus infection in pigs*. Vaccine, 2006. **24**(9): p. 1274-81.
280. Fischer, D., et al., *Intranasal immunization of guinea pigs with an immunodominant foot-and-mouth disease virus peptide conjugate induces mucosal and humoral antibodies and protection against challenge*. J Virol, 2003. **77**(13): p. 7486-91.

281. Taboga, O., et al., *A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants*. J Virol, 1997. **71**(4): p. 2606-14.
282. Tami, C., et al., *Evidence of the coevolution of antigenicity and host cell tropism of foot-and-mouth disease virus in vivo*. Journal of virology, 2003. **77**(2): p. 1219-1226.
283. Xie, Q.C., et al., *Neutralization of foot-and-mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigenic sites*. J Gen Virol, 1987. **68** (Pt 6): p. 1637-47.
284. Kitson, J.D., D. McCahon, and G.J. Belsham, *Sequence analysis of monoclonal antibody resistant mutants of type O foot and mouth disease virus: evidence for the involvement of the three surface exposed capsid proteins in four antigenic sites*. Virology, 1990. **179**(1): p. 26-34.
285. Sarangi, L.N., et al., *Antigenic site variation in foot-and-mouth disease virus serotype O grown under vaccinal serum antibodies in vitro*. Virus Research, 2013. **176**(1): p. 273-279.
286. Shimmon, G., et al., *Generation and characterisation of recombinant FMDV antibodies: Applications for advancing diagnostic and laboratory assays*. PLoS One, 2018. **13**(8): p. e0201853.
287. Burman, A., et al., *Specificity of the VP1 GH loop of Foot-and-Mouth Disease virus for alphav integrins*. J Virol, 2006. **80**(19): p. 9798-810.
288. Dicara, D., et al., *Foot-and-mouth disease virus forms a highly stable, EDTA-resistant complex with its principal receptor, integrin alphavbeta6: implications for infectiousness*. J Virol, 2008. **82**(3): p. 1537-46.
289. Patch, J.R., et al., *Induction of foot-and-mouth disease virus-specific cytotoxic T cell killing by vaccination*. Clin Vaccine Immunol, 2011. **18**(2): p. 280-8.
290. Toka, F.N. and W.T. Golde, *Cell mediated innate responses of cattle and swine are diverse during foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection: A unique landscape of innate immunity*. Immunology Letters, 2013. **152**(2): p. 135-143.
291. Toka, F.N., et al., *Activation of Porcine Natural Killer Cells and Lysis of Foot-and-Mouth Disease Virus Infected Cells*. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2009. **29**(3): p. 179-192.
292. Pedersen, L.E., et al., *Expanding specificity of class I restricted CD8+ T cells for viral epitopes following multiple inoculations of swine with a human adenovirus vectored foot-and-mouth disease virus (FMDV) vaccine*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2016. **181**: p. 59-67.
293. Oh, Y., et al., *Interferon-γ induced by in vitro re-stimulation of CD4+ T-cells correlates with in vivo FMD vaccine induced protection of cattle against disease and persistent infection*. PloS one, 2012. **7**(9): p. e44365-e44365.
294. Abubakar, M., S. Manzoor, and A. Ahmed, *Interplay of foot and mouth disease virus with cell-mediated and humoral immunity of host*. Rev Med Virol, 2018. **28**(2).
295. Díaz-San Segundo, F., et al., *Immunosuppression during acute infection with foot-and-mouth disease virus in swine is mediated by IL-10*. PloS one, 2009. **4**(5): p. e5659-e5659.
296. Monso, M., et al., *Influence of conjugation chemistry and B epitope orientation on the immune response of branched peptide antigens*. Bioconjug Chem, 2013. **24**(4): p. 578-85.
297. Del Val, M., et al., *Efficient processing of an antigenic sequence for presentation by MHC class I molecules depends on its neighboring residues in the protein*. Cell, 1991. **66**(6): p. 1145-53.
298. Yang, M., et al., *Identification of a major antibody binding epitope in the non-structural protein 3D of foot-and-mouth disease virus in cattle and the development of a monoclonal antibody with diagnostic applications*. Journal of Immunological Methods, 2007. **321**(1): p. 174-181.
299. Barnett, P.V., et al., *International bank for foot-and-mouth disease vaccine: assessment of Montanide ISA 25 and ISA 206, two commercially available oil adjuvants*. Vaccine, 1996. **14**(13): p. 1187-1198.

300. Park, M.-E., et al., *Enhanced immune responses of foot-and-mouth disease vaccine using new oil/gel adjuvant mixtures in pigs and goats*. Vaccine, 2014. **32**(40): p. 5221-5227.
301. Fang, M., et al., *Single immunization with a recombinant multiple-epitope protein induced protection against FMDV type Asia 1 in cattle*. International Immunopharmacology, 2015. **28**(2): p. 960-966.
302. Zhang, Z.D., et al., *The effects of gamma interferon on replication of foot-and-mouth disease virus in persistently infected bovine cells*. Arch Virol, 2002. **147**(11): p. 2157-67.
303. Parida, S., et al., *Interferon-gamma production in vitro from whole blood of foot-and-mouth disease virus (FMDV) vaccinated and infected cattle after incubation with inactivated FMDV*. Vaccine, 2006. **24**(7): p. 964-9.
304. Rodriguez, F., et al., *Immunodominance in virus-induced CD8(+) T-cell responses is dramatically modified by DNA immunization and is regulated by gamma interferon*. Journal of virology, 2002. **76**(9): p. 4251-4259.
305. Foster, M., et al., *Serological and cellular immune responses to non-structural proteins in animals infected with FMDV*. Vet Q, 1998. **20 Suppl 2**: p. S28-30.
306. Liao, Y.C., et al., *Identification of cytotoxic T lymphocyte epitopes on swine viruses: multi-epitope design for universal T cell vaccine*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e84443.
307. Painter, M.M., et al., *Antiviral Protection via RdRP-Mediated Stable Activation of Innate Immunity*. PLoS pathogens, 2015. **11**(12): p. e1005311-e1005311.
308. Kardani, K., A. Bolhassani, and S. Shahbazi, *Prime-boost vaccine strategy against viral infections: Mechanisms and benefits*. Vaccine, 2016. **34**(4): p. 413-423.
309. Zhang, Z., et al., *Efficacy of synthetic peptide candidate vaccines against serotype-A foot-and-mouth disease virus in cattle*. Appl Microbiol Biotechnol, 2015. **99**(3): p. 1389-98.
310. Doel, T.R., L. Williams, and P.V. Barnett, *Emergency vaccination against foot-and-mouth disease: Rate of development of immunity and its implications for the carrier state*. Vaccine, 1994. **12**(7): p. 592-600.
311. Hingley, P.J. and T.W. Pay, *Sources of variability in foot and mouth disease vaccine potency estimates based on serum neutralizing antibody assay*. J Biol Stand, 1987. **15**(2): p. 127-42.
312. Black, L., et al., *Foot-and-mouth disease vaccination: a multifactorial study of the influence of antigen dose and potentially competitive immunogens on the response of cattle of different ages*. Res Vet Sci, 1986. **40**(3): p. 303-7.
313. Lee, H.-B., et al., *Artificially designed recombinant protein composed of multiple epitopes of foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate*. Microbial cell factories, 2017. **16**(1): p. 33-33.
314. Rieder, E., et al., *Vaccines prepared from chimeras of foot-and-mouth disease virus (FMDV) induce neutralizing antibodies and protective immunity to multiple serotypes of FMDV*. J Virol, 1994. **68**(11): p. 7092-8.
315. Shao, J.-J., et al., *Promising Multiple-Epitope Recombinant Vaccine against Foot-and-Mouth Disease Virus Type O in Swine*. Clinical and Vaccine Immunology, 2011. **18**(1): p. 143.

